BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTS 72680

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO CYTOMEGALOVIRUS IN HUMAN SERUM



TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO CYTOMEGALOVIRUS IN HUMAN SERUM

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Cytomegalovirus is a herpes virus transmitted by close human contact. No symptoms of infection are apparent in the majority of cases. However, the virus is very dangerous and may be fatal in immuno-depressed patients. Serum-negative female patients who become infected during pregnancy may transmit the disease to the fetus. In 95% of cases this occurs without symptoms, but some neonates may present jaundice, hepato-splenomegaly and retarded psycho-motorial development. For this reason it is of great importance to determine the immune state of the patient and check for serum conversion. A significant increase in the anti-Cytomegalovirus IgG titer is indicative of a recent infection or reactivation of a latent infection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-7).
The antigen, composed of partially purified and inactivated Cytomegalovirus, is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.
After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase.
The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added.
The blue colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulphuric acid solution, the yellow colour which develops can be easily read using a microplate reader.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

Bring to room temperature before use.

MT PLATE *MICROPLATE. 12 x 8 wells coated with Cytomegalovirus.*
Use: open the package on the opposite side from the code (C plus lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CAL *CALIBRATORS. 5 x 1.6 mL*
Contents: Diluted human serum, containing known concentrations of anti-CMV IgG antibodies, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution. The values can be expressed in IU/ml or EU/ml (see section 11 for conversion table). Calibrator 2 (1 IU/ml or 10 EU/mL) corresponds to the cut-off value and can be used in the qualitative test. The calibrators have the following values: 0.5, 1, 5, 10, 20 IU/mL, obtained by titration against the **"Proposed International Standard WHO".**
Colour: the colour of the calibrators is proportional to the relative antibody titer.

CONJ *CONJUGATE. 1 x 16 mL.*
Contents: monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL IgG - *IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL*
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Contents: Human serum not containing anti-CMV IgG antibodies, diluted in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution (Calibrator 0).
Stability: The product is stable up to the expiry date when stored unopened at 2/8°C.

WASH BUF 10x *WASH BUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 mL* ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.
Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 50x *DILUENT 50X (PF93601). 1 x 4.5 mL. For dilution of serum samples.*
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Contents: Proteic solution concentrated 50 times, with added phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.
Preparation: Dilute the required volume 1:50 in the washing buffer to obtain the diluent ready for use.

SUBS TMB *SUBSTRATE (PF93619). 12 mL. Ready for use.* ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M *STOP SOLUTION (PF93602). 1 x 16 mL.* ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
H_2SO_4 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2)
POLYTHENE BAG (1)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.
- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm and 405 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 225-375 µl
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.
The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	**CONDITIONS**
Microplate	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
Calibrators	6 weeks at 2/8°C
Conjugate	6 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	ready for use, 2 weeks at 2/8°C
Rinsing Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY.

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
   a) the Rinsing Buffer contains detergents
   b) the conjugate contains phenol
   c) the substrate is acid
   d) the controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides; dilute with large amounts of water to eliminate.

   If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilised after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralised acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30-minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature**.**
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimised by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyser. See the appropriate operating manual for further details. CO_2 incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
    - installation and particular requisites
    - operating principles, instructions, precautions and risks
    - manufacturer's specifications and instrument performance
    - servicing and maintenance.

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at –20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Defrosted samples must be shaken carefully before use. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.
Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation.
Human plasma cannot be used in the test.

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Prepare the required diluent for samples by adding 1 part of Diluent 50x to 49 parts of the diluted washing buffer (example: 2 mL + 98 mL of diluted washing buffer).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED calibrators (if possible, in duplicate) in a strip (100 µL in each well). Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.
Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl), add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.
After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.
The absorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min. Take the reading again at 405 nm if there are OD higher than 2,000.

9. Scheme of Test Procedure for CYTOMEGALOVIRUS IgG

Manual Technique

STEP 1 Place 100 µL of diluted samples/calibrators to the wells of the strips.

Incubate for 45 min. at 37°C

Wash 4 times (300 µl)

STEP 2 Add 100 µL of conjugate to each well

Incubate for 45 min. at 37°C

Wash 4 times (300 µl)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

1. **CONTROL -** (Calibrator 0): the O.D. of the negative control must be < 0.6 times the O.D. of Calibrator 2.
2. The O.D. of Calibrator 2 must be ≥ 0.2 at 450 nm; >= 0.16 at 450/620 nm.
3. The O.D. of Calibrator 5 must be over 1.2.

11. INTERPRETATION OF RESULTS

QUANTITATIVE RESULTS

Report the OD of the calibrators on a graph after subtracting the OD of the blank (<= 0.150). The corresponding titer of the test sample can be obtained by extrapolation.

NOTE: A standard curve must be performed for each run.

If the O.D. of any sample or calibrator is over 2.0, take the reading at 405 nm and multiply the value by 3.

Conversion of the O.D. into units/mL

The anti-Cytomegalovirus IgG can be expressed in EU/mL (arbitrary units) or in IU/mL (proposed anti CMV IgG WHO standard), by extrapolating the results of the 6 calibrators and comparing the OD of the sample with the curve obtained.

Table 1: Calibrator Values in arbitrary and international units

	EU/mL	IU/mL
Calibrator 0	0	0
Calibrator 1	5	0.5
Calibrator 2	10	1
Calibrator 3	50	5
Calibrator 4	100	10
Calibrator 5	200	20

The degree of immunity can be interpreted as follows:

IMMUNE: when the anti-Cytomegalovirus IgG concentration in the sample is > 12 EU/mL or 1.2 IU/mL

NON IMMUNE: when the anti-Cytomegalovirus concentration is < 8 EU/mL or < 0.8 IU/mL

DOUBTFUL: if the result is between the two values. In this case it is advisable to repeat the test in duplicate.

QUALITATIVE RESULTS

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (Calibrator 2). The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2
Doubtful: > 0.8 - < 1.2
Negative: if the ratio is < 0.8

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

Heat-inactivation of the test serum does not give rise to erroneous results in the determination of anti-CMV IgG, as in the case of anti-CMV IgM.

The Cytomegalovirus IgM level should be determined using the Platelia™ CMV IgM kit. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.

The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of the case history or other diagnostic procedures.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

23 samples which were negative for CMV, but containing IgG antibodies against viruses such as Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex, Measles, Mumps, were tested. In no case did the presence of these antibodies influence the test.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 264 samples were analysed, 47 of which proved negative and 217 positive. The samples were analysed with another commercial immunoenzymatic method: 100% agreement was found between the two methods, both in the positive and the negative samples.

The Platelia™ CMV IgG kit offers 100% sensitivity and specificity.

15. PRECISION

Table 2: Within-run Precision performed on 3 different lots

Cut Off n=21	***Batch. N.104***	***Batch. N. 105***	***Batch. N. 106***
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Table 3: "Between-run" Precision

	EU/ml			
Sample	**I run**	**II run**	**III run**	**CV%**
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	**POSSIBLE SOURCE**	**TEST OR ACTION**
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert paragraph 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessicant must be pale yellow). Repeat test.
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Colour development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTS 72680

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON IgG-ANTIKÖRPERN GEGEN DAS CYTOMEGALOVIRUS IN HUMANEM SERUM



INHALTSVERZEICHNIS

1. VERWENDUNGSZWECK

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON IgG-ANTIKÖRPERN GEGEN DAS CYTOMEGALOVIRUS IN HUMANEM SERUM.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Cytomegalovirus ist ein Herpesvirus, das durch engen menschlichen Kontakt übertragen wird. In den meisten Infektionsfällen treten keine Symptome auf. Das Virus ist aber durchaus gefährlich und kann für immunsupprimierten Patienten tödlich sein. Serum-negative weibliche Patienten, die während der Schwangerschaft infiziert werden, können die Erkrankung auf den Foetus übertragen. In 95 % der Fälle bleibt dies symptomlos, jedoch entwickeln einige Neugeborene eine Gelbsucht oder Hapato-Splenomegalie bzw. weisen eine verzögerte psycho-motorische Entwicklung auf. Daher ist es von großer Wichtigkeit, den Immunstatus der Patientinnen vor Eintritt einer Schwangerschaft zu ermitteln und auf eine Serokonversion zu überprüfen. Ein signifikanter Anstieg des Anti-Cytomegalovirus IgG-Titers ist ein Anzeichen für eine kürzlich durchgemachte Infektion oder eine Reaktivierung einer latenten Infektion.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (1-7).
Das Antigen, teilweise gereinigtes und inaktiviertes Cytomegalovirus ist an eine Festphase (Streifen mit je 8 Vertiefungen) gebunden. Die spezifischen Immunglobuline werden bei der Inkubation mit verdünntem Patientenserum an das Antigen gebunden.
Die ungebundenen Proteine, die nicht reagiert haben, werden aus den Wells gewaschen; danach folgt eine Inkubation mit dem Konjugat aus monoklonalen humanen IgG-Antikörpern, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt sind.
Das ungebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidase Substrat zugegeben.
Die blaue Farbe, die sich entwickelt, ist proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern, die in der Probe vorhanden sind. Wenn die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäurelösung gestoppt wird, kann die entstandenen gelbe Farbe einfach mit einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

4. INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen..

Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

MT PLATE *MIKROTITERPLATTE. 12x8 Vertiefungen, beschichtet mit Cytomegalovirus.*
Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (C plus Chargennummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beigefügten Plastikbeutel mit dem Silica Gel lagern; die Luft herausdrücken und gut verschließen.

CAL *KALIBRATOREN 5 x 1.6 ml.*
Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannten Konzentrationen von Anti-CMV IgG-Antikörpern, in 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung. Die Werte können in IU/ml oder EU/ml angegeben werden (s. Umrechnungstabelle Abschnitt 11). Calibrator 2 (1 IU/ml or 10 EU/ml) entspricht dem Cut-off und kann für die qualitative Testdurchführung verwendet werden. Die Kalibratoren enthalten folgende Konzentrationen : 0,5 – 1 – 5 – 10 – 20 IU/ml, erhalten durch Titration gegen den **„Proposed International Standard WHO“**.
Farbe: Die Farbintensität der Kalibratoren ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONJ *KONJUGAT. 1 x 16 ml.*
Inhalt: monoklonale Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0,05 % Phenol und 0,02 % Bronidox. Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

CONTROL IgG - *IgG NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1.6 ml.*
Chargen untereinander austauschbar
Inhalt: Humanserum, das keine Anti-CMV IgG-Antikörper enthält, verdünnt mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer, mit 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung (Calibrator 0).
Stabilität: Das Produkt ist ungeöffnet bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

WASH BUF 10x *WASCHPUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 ml.* ***Chargen untereinander austauschbar***
Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0,5 % Brij.
Vorbereitung: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten Sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

SAMP DIL 50x *DILUENT 50X (PF93601 ; PROBENVERDÜNNUNGSLÖSUNG). 1 x 4.5 ml. Für die Verdünnung von Serumproben* ***Chargen untereinander austauschbar***
Inhalt: Proteinlösung, 50fach konzentriert, mit 0,05 % Phenol und 0,02 % Bronidox.
Vorbereitung: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:50 mit Waschpuffer, um das gebrauchsfertige Diluent herzustellen.

SUBS TMB *SUBSTRAT (PF93619). 1x12 ml. Gebrauchsfertig.* ***Chargen untereinander austauschbar***
Inhalt: 0,26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0,01% Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0,05 mol/l Zitratpuffer (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *STOPPLÖSUNG (PF93602). 1 x 16 ml.* ***Chargen untereinander austauschbar***
Inhalt: H_2SO_4 0.3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

KLEBEFOLIE (2).
POLYTHENBEUTEL (1).

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN
- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplatten Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis ≥2,000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispensiervolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 µl
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorid-Lösung (5%)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN
Die Reagenzien müssen bei 2-8 °C gelagert werden.
Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.

REAGENZ	KONDITIONEN
MIKROTITERPLATTE	6 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel
KALIBRATOREN / KONTROLLSEREN	6 Wochen bei 2-8 °C
KONJUGAT	6 Wochen bei 2-8 °C
SUBSTRAT	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C bzw. 1 Woche bei 15-30°C im Dunkeln
STOPPLÖSUNG	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C
DILUENT	2 Woche bei 2-8 °C; gebrauchsfertig
WASCHPUFFER	2 Wochen bei 2-8 °C bzw. 5 Tage bei 15-30 °C

6. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO DIAGNOSTIK.
Achtung: Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, das mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ war. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Agentien enthalten, sollten alle Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

Gesundheits- und Sicherheitsinformationen
1. Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.

2. Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:

a) Der Waschpuffer enthält Detergenzien
b) Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol.
c) Das Substrat ist eine Säure.
d) Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden. Reagenzienreste sollten daher mit reichlich Wasser verdünnt beseitigt werden.

Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.

3. Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121 °C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.

4. Schwefelsäure (Stop Soution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.

5. Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigkabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorid mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorid (1%) ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.

6. Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorid (1 %) nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorid sollte nicht bei verschütter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorid enthalten.

Technische Vorsichtsmaßnahmen

1. Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass die Temperatur bei der 1. Inkubation nicht unterhalb 35° C und nicht über 39°C liegt.**
2. Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Halbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
3. Die Testduchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
4. Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
5. Vermeiden Sie Gefrierschränke mit Abtauautomatik für die Lagerung von Proben.
6. Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorid-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
7. Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
8. Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
9. Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
10. Enzymimmunoassays können gelegentlich einen "Edge-Effect" zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37°C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig,) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO_2 Inkubatoren.
11. Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.
12. Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren, oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.

13. Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
    - Installation und besondere Bedarfsartikel
    - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
    - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
    - Service und Wartung.

7. ART UND LAGERUNG DER PROBEN

Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Die Qualität einer Probe kann durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden und führt zu falschen Ergebnissen.
Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden. Falls keine neue Probe verfügbar ist, sollten solche Proben durch Filtration (0,45 µm) geklärt oder zentrifugiert (3000 rpm x 10') werden.
Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor. Doppelbestimmung wird empfohlen.
- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Rinsing Buffer 1:10 (Beispiel 10 ml + 90 ml H_2O).
- Bereiten Sie die benötigte Menge Diluent vor: Verdünnen Sie 1 Teil Diluent (50x) mit 49 Teilen verdünntem Waschpuffer (Beispiel: 2 ml Diluent + 98 ml verdünnter Waschpuffer).

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Lassen Sie eine Vertiefung (well) für den Substratleerwert frei. 100 µl der Kalibratoren in je eine Vertiefung pipettieren. 100 µl der verdünnten Proben in je ein Well (Doppelbestimmung) pipettieren. Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37°C inkubieren. 4-mal mit 0,3 ml verdünntem Waschpuffer waschen (mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Konjugat in alle Wells pipettieren (außer Substratleerwert). Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37°C inkubieren. 4-mal mit 0,3 ml verdünntem Waschpuffer waschen (mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert). 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert). Die Extinktion bei 450 nm oder 450/620 innerhalb von 30 Minuten messen. Wiederholen Sie die Messung bei 405 nm, falls einige ODs über 2,000 liegen.

9. TESTSCHEMA CYTOMEGALOVIRUS IgG

SCHRITT 1	100 µl der verdünnten Probe/ Blank Reagenz/ Kalibratoren in die entsprechenden Wells pipettieren.
	45 Min. bei 37°C inkubieren.
	4-mal waschen (300 µl).
SCHRITT 2	100 µL Konjugat in alle Wells pipettieren.
	45 Min. bei 37 °C inkubieren.
	4-mal waschen (300 µl).
SCHRITT 3	100 µl Substrat in alle Wells pipettieren.
	15 Min. bei Raumtemperatur.
SCHRITT 4	100 µL Stopplösung hinzufügen.
	Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Min.

10. TESTVALIDIERUNG

1. **CONTROL –** (Calibrator 0): Die optische Dichte (OD) der Negativkontrolle muss < 0,6fache der OD des Calibrator 2 sein.
2. Die OD des Calibrator 2 muss ≥ 0,2 sein bei 450 nm; ≥ 0,16 bei 450/620 nm.
3. Die OD des Calibrator 5 muss > 1,2 sein.

11. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

QUANTITATIVE ERGEBNISSE

Tragen Sie die ODs der Kalibratoren nach Abzug der Blank ODs (<= 0.150) auf Millimeterpapier auf. Die dazugehörigen Titer der Probe können durch Extrapolation abgelesen werden.
HINWEIS: Für jeden Testansatz muss eine Eichkurve erstellt werden. Falls die ODs irgendeiner Probe oder eines Kalibrators über 2,0 liegen, messen Sie diese nochmals bei 405 nm und multiplizieren Sie den Wert mit 3.

Umrechnung der OD in IU/ml

Die Anti-Cytomegalovirus IgG können in EU/ml (willkürlich festgelegte Einheiten) oder IU/ml (von der WHO vorgeschlagener Anti-CMV IgG Standard) angegeben werden, durch Interpolation der ODs der 6 Calibrators und deren Vergleich in der Eichkurve mit den ODs der Proben.

	EU/mL	IU/mL
Calibrator 0	0	0
Calibrator 1	5	0.5
Calibrator 2	10	1
Calibrator 3	50	5
Calibrator 4	100	10
Calibrator 5	200	20

Der Grad der Immunität kann folgendermaßen interpretiert werden:
Immun: wenn die Anti-Cytomegalovirus IgG-Konzentration > 12 EU/ml oder 1,2 IU/ml ist.
Nichtimmun: wenn die Anti-Cytomegalovirus IgG-Konzentration < 8 EU/ml oder 0,8 IU/ml ist
Zweifelhaft: Ein Ergebnis zwischen diesen beiden Werten. In diesem Falle sollte die Probenbestimmung in Doppelbestimmung wiederholt werden.

QUALITATIVE ERGEBNISSE

Berechnen Sie das Verhältnis zwischen Extinktionsmittelwert der Probe und dem des Cut-Off (Calibrator 2).
Die Probe ist :
Positiv: > 1,2
Zweifelhaft: ± 20 % des Cut-off
Negativ: < 0,8
Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Eine Serumprobe, die in der akuten Phase einer Infektion entnommen wurde, wenn nur IgM-Antikörper vorhanden sind, kann in diesem Test negativ ausfallen.
Cytomegalovirus-IgM-Werte sollten mit dem Testsatz Cytomegalovirus IgM bestimmt werden. Alternativ können Sie auch nach 8-14 Tagen erneut IgG bestimmen, um einen Anstieg zu überprüfen.
Zur Erstellung der Diagnose sollte die Bestimmung von Cytomegalovirus immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.
Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden 23 Proben gestestet, die negative für CMV waren, aber IgG-Antikörper gegen Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex, Masern und Mumps enthielten. In keinem Fall wurde dieser Test durch das Vorhandensein dieser Antikörper beeinflusst.

14. DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer klinischen Studie wurden 264 Proben getestet, von denen 47 negativ und 217 positiv waren.
Die Proben wurden einer anderen kommerziellen Enzymimmunoassay-Methode getestet: Es wurde eine 100%ige Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden gefunden, sowohl für positive als auch für negative Proben.
Dieser Assay bietet damit eine Sensitivität und Spezifität von 100 %.

15. PRÄZISION

Intraassay Präzision in 3 verschiedenen Chargen

Cut-off n=21	*Charge Nr. 104*	*Charge Nr. 105*	*Charge Nr. 106*
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Interassay-Präzision

	EU/ml			
Probe	**Test I**	**Test II**	**Test II**	**CV%**
Nr. 1	12.6	17.5	17.6	18
Nr. 2	78.5	87.5	96.3	10

16. "TROUBLE SHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

PROBLEM	**MÖGLICHE URSACHE**	**MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG**
Ungültiger Testlauf (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testlauf (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.
	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschritt. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

17. LITERATUR

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE	- CE marking (European directive 98/79/CE on in vitro diagnostic medical devices) - EG Markierung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika)
IVD	- For *in vitro* diagnostic use - *In vitro*-Diagnostikum
	- Manufacturer - Hersteller
	- Storage temperature limitation - Lagerungstemperatur
	- Consult Instruction for use - Siehe Gebrauchsanweisung

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE **0459**
12/2004

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTS 72680

TROUSSE POUR LA DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ANTICORPS IgG ANTI-CYTOMEGALOVIRUS DANS LE SERUM HUMAIN PAR TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE



SOMMAIRE

1. BUT DU DOSAGE

PLATELIA™ CMV IgG EST UNE TROUSSE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ANTICORPS IgG ANTI-CYTOMEGALOVIRUS DANS LE SERUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

Le Cytomégalovirus (CMV) appartient à la famille des herpesvirus et se transmet par contact humain étroit. La majorité des infections à CMV sont asymptomatiques. Mais quand le système immunitaire est immature ou compromis, les infections primaires, réactivations ou réinfections peuvent être extrêmement sévères. Chez la femme enceinte, le CMV est transmis via le placenta ou à la naissance. Dans 95% des cas, la transmission est asymptomatique, mais certains nouveaux-nés peuvent présenter une jaunisse, une hépato-splénomégalie ou un retard du développement psychomoteur. La recherche des anticorps anti-CMV permet de définir le statut immunitaire du patient. Une augmentation significative du titre des IgG anti-CMV indique une infection récente ou la réactivation d'une infection ancienne.

3. PRINCIPE DU TEST

Le principe du test est un dosage immuno-enzymatique de type Elisa indirecte. L'antigène CMV (purifié et inactivé) est fixé sur la phase solide (cupules de la microplaque). Les échantillons dilués et les calibrateurs sont déposés dans les cupules de la microplaque. Pendant cette incubation, 45 minutes à 37°C, les anticorps anti-CMV, présents dans l'échantillon, se lient à l'antigène. Les protéines non liées sont éliminées par lavages, pratiqués à la fin de l'incubation. Le conjugué (anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase) est ensuite déposé dans toutes les cupules et incubé 45 minutes à 37°C.
Le conjugué non lié est éliminé par lavages à la fin de cette deuxième incubation. La présence du complexe immun (phase solide, IgG anti-CMV, acm-POD) est révélé par l'addition dans chaque cupule d'une solution de révélation enzymatique. Après cette troisième incubation, la réaction enzymatique est stoppée par l'addition dans chaque cupule de l'acide sulfurique H_2SO_4, 0.3 M.
La densité optique obtenue à 450 nm ou 450/620 nm est proportionnelle à la concentration d'IgG anti-CMV présentes dans le sérum.

4. COMPOSITION DE LA TROUSSE ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 96 déterminations.

- **Laisser les réactifs revenir à température ambiante avant utilisation.**

MT PLATE *MICROPLAQUE : 12 x 8 puits sécables sensibilisés avec l'antigène CMV.*
Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (C, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage, et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice; chasser l'air et fermer le sachet par pression sur la fermeture.

CAL *CALIBRATEURS. (5 x 1,6 ml)*
Composition : Sérums humains dilués contenant des quantités connues d'anticorps IgG anti-CMV, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Ils se présentent sous forme liquide, et sont prêts à l'emploi sans autre dilution. Les valeurs peuvent être exprimées en UE/ml ou UI/ml (voir la section 11 - table de conversion). Le Calibrateur 2 (1 UI/ml ou 10 UE/ml) correspond au contrôle seuil et il peut être utilisé dans l'analyse qualitative. Les valeurs des calibrateurs sont 0.5, 1, 5, 10, 20 UI/ml, obtenues par titrage contre le « Standard International proposé – OMS ».
Couleur : la couleur des calibrateurs est proportionnelle à leur concentration en anticorps.

CONJ *CONJUGUE (1 x 16 ml)*
Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgG marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05% de phénol et 0.02% de bronidox.
Prêt à l'emploi.

CONTROL IgG - *CONTROLE NEGATIF IgG (PF93910) (1 x 1,6 ml)*
INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS
Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous forme liquide, prêt à l'emploi sans autre dilution. (Calibrateur 0).

WASH BUF 10x *TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603)(1 x 100 ml)* ***INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS***

Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5% de brij.

Préparation : Diluer au 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.

En présence de cristaux : chauffer la solution **à 37°C** pour les solubiliser puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 50x *DILUANT ECHANTILLON 50X (PF93601) (1 x 4.5 ml).*
INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS

Composition : Solution protéique (concentrée 50 fois), additionnée de 0.05% de phénol et 0.02% de bronidox.

Préparation : Diluer au 1/50 dans le tampon de lavage dilué pour obtenir une solution de diluant prête à l'emploi.

SUBS TMB *SUBSTRAT (PF93619) (1 x 12 ml). Prêt à l'emploi.* ***INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS***

Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/ml) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H_2SO_4 0.3 M *SOLUTION D'ARRET (PF93602) (1 x 16 ml)* ***INTERCHANGEABLE ENTRE LOTS***

Composition : H_2SO_4 (à 0.3 mol/l) dans une solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)
FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37°C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm et 405 nm avec une linéarité jusqu'à 2.000)
- Laveur de microplaques (recommandé) capable de dispenser des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvette, pipette, etc.)
- Micropipette capable de prélever 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à usage unique
- Minuteur
- Solution d'hypochlorure de sodium (5%)
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à +2-8°C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette du coffret.

Stabilité des réactifs après ouverture et/ou reconstitution.

REACTIF	**STABILITE**
MICROPLAQUE	6 semaines à +2-8°C dans le sachet en polyéthylène
CALIBRATEURS	6 semaines à +2-8°C après ouverture
CONJUGUE	6 semaines à +2-8°C après ouverture
SUBSTRAT	jusqu'à la date de péremption à +2-8°C, 1 semaine à +15-30°C, à l' obscurité
DILUANT	dilué, 2 semaines à +2-8°C
TAMPON DE LAVAGE	dilué, 2 semaines à +2-8°C, 5 jours à +1530°C
SOLUTION D'ARRET	jusqu'à la date de péremption à +2-8°C

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION

TOUS LES REACTIFS SONT DESTINES A L'USAGE EXCLUSIF DU DIAGNOSTI *IN-VITRO*
ATTENTION :
Ce coffret contient des matériaux d'origine humaine. Les réactifs contenant du matériel d'origine humaine ont été contrôlés et trouvés négatifs en anticorps anti-VIH-1/VIH-2, anti-VHC et en antigène HBs (selon la méthode FDA). Cependant, ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et par conséquent manipulés avec précaution.

CONSIGNES D'HYGIENE ET SECURITE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des gants à usage unique et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et pendant la réalisation du test. Se laver soigneusement les mains après la manipulation.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations en substances nocives ou irritantes :
   a) le tampon de lavage contient des détergents
   b) le conjugué contient du phénol
   c) le substrat est acide.
   d) les calibrateurs et contrôles contiennent de l'azide de sodium (0,09%). Les azides peuvent réagir avec les métaux (cuivre et plomb) des canalisations pour former des composés explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, ne pas jeter dans un évier sans rincer abondamment.
   En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment à l'eau.
3. Tout matériel non jetable doit être stérilisé après utilisation, de préférence en autoclave à 121°C pendant 1 h. Tout matériel jetable doit être autoclavé ou incinéré après utilisation.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec précaution. En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment avec de l'eau.
5. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec un volume suffisant de solution d'hypochlorure de sodium pour que la concentration finale soit de 1% minimum. Un contact de 30 minutes avec cette solution est nécessaire pour garantir une décontamination efficace.
6. En cas de versement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1%), avant de continuer le test. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorure de sodium. Tout matériel (notamment les gants) souillé par d'éventuelles éclaboussures doit être considéré comme potentiellement infectieux et éliminé selon la réglementation en vigueur.

PRECAUTIONS ANALYTIQUES

1. Laisser les réactifs et les échantillons revenir à température ambiante (+18-30°C) avant utilisation. Immédiatement après utilisation, conserver les réactifs à la température de conservation recommandée. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au dessous de 35°C ni monter au dessus de 39°C. Laisser le sachet contenant les barrettes revenir à température ambiante pendant 30 minutes avant de l'ouvrir.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption . Eviter toute contamination microbienne des réactifs ce qui pourrait affecter les résultats.
3. Ne pas modifier le mode opératoire indiqué, ni remplacer les réactifs par d'autres provenant de lots ou de fournisseurs différents (à moins que cela ne soit spécifié sur la notice d'utilisation). Se référer au paragraphe « COMPOSITION DU COFFRET ET PREPARATION DES REACTIFS »). Ne pas réduire les temps d'incubation indiqués.
4. Toute verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée.
5. Ne pas exposer les réactifs à une forte lumière ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ni pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des cônes différents pour chaque réactif.
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec un couvercle et incubées à 37°C soit dans un bain-marie, soit dans un incubateur, soit dans un analyseur adapté. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO_2.

10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulles d'air à la surface du liquide.
11. Les échantillons fortement hémolysés, les sérums incomplètement coagulés, les plasmas contenant de la fibrine, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
12. Lire attentivement le manuel d'utilisation des instruments utilisés ; en particulier les chapitres concernant:
    - l'installation et les précautions spécifiques
    - le principe, les instructions, les précautions et risques d'utilisation
    - les spécifications du fabricant et les performances de l'instrument
    - la maintenance.

7. ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum frais ou décongelé. Les échantillons peuvent être stockés à +2/+8°C pendant 4 jours.

Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20°C. Il ne faut pas les décongeler et recongeler plus de 3 fois. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant utilisation.

Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent altérer les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés. S'il n'est pas possible de prélever un autre échantillon, il faut le clarifier par filtration (0,45 µm) ou par centrifugation (3000 tpm pendant 10 minutes).
Ne pas utiliser d'échantillon de plasma humain.

8. MODE OPERATOIRE

Préparation

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparer la solution tamponnée de lavage :
  Diluer la solution **de lavage concentrée** (par exemple : 100 ml + 900 ml d'eau distillée).
- Préparer le diluant échantillon :
  Pour un volume de **diluant concentré** 50X, ajouter 49 volumes de **tampon de lavage dilué** (exemple : 2 ml dans 98 ml de tampon de lavage dilué).

Exécution

Diluer les échantillons au 1/101è en distribuant 10µl de sérum dans 1 ml de diluant. Distribuer 100 µl des contrôles NON dilués puis 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double).
Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits.

PROCEDURE QUALITATIVE

Il est indispensable d'avoir au minimum 1 négatif (calibrateur 0), 2 cut-off (calibrateur 2) et 1 contrôle positif (calibrateur 5).
Couvrir les puits avec la feuille de protection.
Incuber pendant 45 minutes à 37°C ±2°C. Laver 4 fois (temps de contact de 30 secondes, 300 µl).
Ajouter 100 µl du conjugué dans chaque puits.
Couvrir les puits avec la feuille de protection.
Incuber pendant 45 minutes à 37°C±2°C. Laver la plaque encore 4 fois comme mentionné précédemment.
Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
Incuber 15 minutes à température ambiante (+18-30°C) à l'obscurité.
Ajouter 100 µl de solution d'arrêt.
Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes. Lire la D.O. de nouveau à 405 nm s'il y a des D.O. supérieures à 2,000.

PROCEDURE QUANTITATIVE

Pour la procédure quantitative, il faut utiliser les 6 calibrateurs (calibrateurs 0 à 5) : 0 ; 0,5 ; 1, 5 ; 10 et 20 UI/ml, si possible en double. Distribuer 100 µl de chaque calibrateur non dilué dans la microplaque puis 100 µl des échantillons dilués. Le reste de la procédure est identique à celle du test qualitatif.

9. *RESUME DU MODE OPERATOIRE – PLATELIA™ CMV IgG*

1ère étape	Mettre 100 µl de sérum dilué ou de contrôles/calibrateurs dans les puits de la microplaque
	Incuber pendant 45 mn à 37°C
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)
2ème étape	Mettre 100 µl du conjugué dans les puits
	Incuber pendant 45 mn à 37°C
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)
3ème étape	Mettre 100 µl du substrat dans les puits
	Incuber pendant 15 mn. à T.A.
4ème étape	Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits
	Lire la densité optique à 450 nm ou 450/620 nm dans les 30 minutes.

10. CRITERES DE VALIDATION DU TEST

1. **CONTROL -** (Calibrateur 0) : la D.O.du contrôle négatif doit être inférieure à 0,6 fois la D.O. du Calibrateur 2.
2. La D.O. du Calibrateur 2 doit être >= 0.2 à 450 nm.
   La DO du Calibrateur 2 doit être supérieure ou égale à 0.160 à 450/620 nm.
3. La D.O. du Calibrateur 5 doit être supérieure à 1.2.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

RESULTATS QUANTITATIFS

Lire les absorptions des calibrateurs à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (<= 0.150). Construire un graphique avec ces valeurs. On obtient le titre de chaque échantillon en extrapolant les D.O.
NOTE : Il faut construire une courbe standard pour chaque plaque.
Si la D.O. d'un sérum ou d'un échantillon est supérieure à 2.0, lire la D.O. à 405 nm et multiplier la valeur par 3.

Conversion des D.O. en unité/ml

Les IgG anti-CMV de chaque sérum peuvent être exprimées en unités arbitraires (UE/ml) ou en UI/ml (proposed anti-CMG IgG WHO Standard), en extrapolant les valeurs de DO des 6 calibrateurs et en comparant la valeur de D.O. de l'échantillon avec la courbe ainsi obtenue.

Tableau 1: Valeur des calibrateurs en unités arbitraires et internationales

	UE/ml	UI/ml
Calibrateur 0	0	0
Calibrateur 1	5	0.5
Calibrateur 2	10	1
Calibrateur 3	50	5
Calibrateur 4	100	10
Calibrateur 5	200	20

Le niveau d'immunité peut être interprété comme suit :
IMMUNISE : quand la concentration des IgG anti-CMV dans l'échantillon est > 12 UE/ml ou 1.2 UI/ml.
NON IMMUNISE : quand la concentration des IgG anti-CMV est <8 UE/ml ou <0.8 UI/ml.
DOUTEUX : quand la valeur est comprise entre les deux valeurs. Dans ce cas, il faut retester l'échantillon en double.

RESULTATS QUALITATIFS
Calculer le rapport (ratio) entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Calibrateur 2).

L'échantillon est considéré comme :
Positif : si le ratio est supérieur à 1.2
Douteux : si le ratio est compris entre 0.8 et 1.2
Négatif : si le ratio est inférieur à 0.8

Si le résultat est douteux, répéter le test. Si le résultat est de nouveau douteux, réaliser le test sur un nouveau prélèvement de sang.

12. LIMITES DE LA METHODE

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode.
A la différence du test en IgM, l'inactivation par la chaleur du sérum en examen ne donne pas lieu à des résultats erronés.
Le niveau des IgM anti-Cytomégalovirus doit être déterminé en utilisant le coffret Platelia™ CMV IgM. Alternativement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard devrait être contrôlé en parallèle pour évaluer l'évolution du titre des anticorps IgG.
Le diagnostic ne doit pas se fonder seulement sur les résultats biologiques, mais doit aussi prendre en compte l'ensemble des données cliniques.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

23 échantillons de sérum négatifs en anticorps anti-CMV, contenant des IgG anti-Rubéole, Epstein Barr, Herpes Simplex, Rougeole et Oreillons, ont été testés.
Aucune interférence n'a été observée.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

Les performances de Platelia™ CMV IgG ont été évaluées dans un laboratoire hospitalier sur 264 échantillons (47 négatifs et 217 positifs) et comparées à une autre trousse immunoenzymatique. La concordance entre les 2 techniques est de 100%.

Platelia™ CMV IgG présente une sensibilité et une spécificité de 100%.

15. PRECISION

Tableau 2 : Répétabilité intra-essai effectuée sur 3 lots différents

Cut Off n=21	***Lot N.104***	***Lot N. 105***	***Lot N. 106***
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Tableau 3 : Précision inter-essais

	UE/ml			
Sample	**I run**	**II run**	**III run**	**CV%**
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

16. EXPERTISE DES CAUSES D’ERREUR

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
Manipulation invalidée **Tous les résultats sont négatifs**	Absence d’un ou plusieurs réactifs, ou addition de réactifs dans un ordre erroné	Contrôler le procédé. Contrôler s’il y a une solution inutilisée. Répéter le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire les instructions pour l’usage, section 4).
		Contrôler s’il y a de l’humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit être d’une couleur jaune pâle). Répéter le test.
Manipulation invalidée **Tous les résultats sont positifs**	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle aliquote du substrat.
	Lavage insuffisant	S’assurer que le laveur fonctionne correctement
Mauvaise précision	Lavage incomplet des puits	S’assurer que le laveur fonctionne correctement
	Aspiration insuffisante des puits	S’assurer que le laveur fonctionne correctement
	Erreur du pipetage	S’assurer que la pipette fonctionne correctement
	Addition des réactifs trop longue	Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d’air	Eviter la formation des bulles d’air pendant le pipetage.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse pour la présence d’impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec du papier.
Développement de la couleur insuffisante	Temps ou température d’incubation pas correcte	Vérifier le contrôle de la température et du temps d’incubation
		Suivre attentivement les instructions d’utilisation.
	Volume incorrect de substrat additionné à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 PRUEBAS 72680

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ANTI CYTOMEGALOVIRUS EN SUERO HUMANO



RESUMO

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ANTI CYTOMEGALOVIRUS EN SUERO HUMANO.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El Cytomegalovirus es un virus herpes que se transmite por estrecho contacto humano. La mayoría de los seres humanos resulta infectada de manera asintomática. El virus es particularmente grave en los pacientes inmunodeprimidos, en los cuales puede causar la muerte. Las mujeres sueronegativas que contraen esta enfermedad durante el embarazo pueden transmitirla al feto. En 95% de los casos esto sucede sin consecuencias pero en los neonatos sintomáticos puede causar ictericia, epato-esplenomegalia y retraso psicomotor. Por esta razón es importante determinar el título del anticuerpo de la paciente y observar la eventual sueroconversión. Un aumento significativo en el título de IgG anti Cytomegalovirus sugiere una recién infección o una reactivación de una infección latente.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
El antígeno, constituido por cytomegalovirus parcialmente purificado e inactivo, está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.
Después de varios lavados para eliminar las proteinas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa de rafano.
El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato peroxidasa. El color azul que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.
Cuando la reacción enzimática está interrumpida después de la adición de una solución de ácido sulfúrico la coloración amarilla resultante puede ser facilmente leída con un lector para microplacas ELISA.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.
- **Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.**

MT PLATE *MICROPLACA 12 x 8 pocillos recubiertos de antígenos Cytomegalovirus.*
Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (C seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CAL *CALIBRADORES 5 x 1.6 mL*
Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-CMV IgG, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y azida sódica al 0,09%, liquido, líquido listo para su uso sin diluciones adicionales. El Calibrador 2 (10 EU/mL) corresponde al valor del cut-off y puede ser usado en el test cualitativo. Los calibradores tienen los valores siguientes: 0.5, 1, 5, 10, 20 UI/ml obtenidos por titulación contra el “proposed International Standard - WHO .
Color: el color de los calibradores es proporcional a la relativa titulación del anticuerpo.

CONJ *CONJUGADO. 1 x 16 mL.*
Contenido: anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CONTROL IgG - *IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Suero humano sin anticuerpos anti- CMV IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional(Calibrador 0).

WASH BUF 10x *TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603). 1 x 100 mL* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Solución salina fosfato tamponada, concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 50x *DILUYENTE 50X (PF93601). 1 x 4.5 mL.* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Para la dilución de las muestras de suero.
Contenido: Solución de proteínas concentrada 50x, con fenol al 0,05% adicional y Bronidox 0.02%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:50 en el tampón de lavado para obtener el diluyente listo para su uso.

SUBS TMB *SUBSTRATO (PF93619). 12 mL. Listo para su uso.* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602). 1 x 16 mL* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Solución de H_2SO_4 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).
BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.
- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000) (por lo menos)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volumenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	**CONDICIONES**
MICROPLACA	6 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CALIBRADORES	6 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	6 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C ; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	listo para su uso 2 semanas 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la caducidad a 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO.* CONSERVAR A 2-8°C
Cuidado:
Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos , cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Informaciones de Salud y Seguridad:
1. No pipetear por via oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.

2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
    a) el tampón de lavado contiene detergentes
    b) el conjugado contiene fenol
    c) el substrato es ácido
    d) los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas. Para eliminarla, diluir con mucha agua.

    Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben disinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de se que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada . Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta**. **Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" (“efecto filo”) que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
12. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
    - instalación y requisitos específicos
    - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
    - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
    - mantenimiento y servicio técnico.

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra está representado por el suero recogido normalmente de la vena y manejado con apropiadas precauciones como requerido por la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a –20ºC, y deshelar hasta un máximo de 3 veces. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.
No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas. Si no es posible recoger una muestra nueva, las muestras pueden ser aclaradas por medio de filtración (0,45 µm) o centrifugación (3000 rpm x 10').
El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO DEL TEST

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Rinsing Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Preparar el volumen requerido de diluyente para las muestras añadiendo 1 parte de Diluent 50x a 49 partes del tampón de lavado diluido (ejemplo: 2 mL + 98 mL).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los calibradores SIN DILUIR en una tira, preferiblemente por duplicado (100 µL para cada pocillo). Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla substrato.
Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µl). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.
Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.
Leer la Absorbancia (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.
Leer otra vez a 405 nm si están OD superiores a 2.000.

9. Procedimiento de la prueba para CYTOMEGALOVIRUS IgG

Método Manual

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/calibradores en los pocillos.

Incubar 45 min. a 37°C

Lavar 4 veces (300 µl)

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

Incubar 45 min. a 37°C

Lavar 4 veces (300 µl)

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

Incubar 15 min. a T.A.

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

1. Calibrador 0 (Control Negativo): la densidad óptica (DO.) del control negativo debe ser < 0,6 veces la D.O. del Calibrador 1.
2. La D.O. del Calibrador 2 debe ser ≥ 0.2 a 450 nm; >= 0.16 a 450/620 nm
3. La D.O. del Calibrador 5 debe ser más de 1.2.

11. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Resultados Cuantitativos
Poner en el gráfico las D.O. de los calibradores, restando la D.O. del blanco (<= 0.150), en función del título de cada un calibrador.
Obtener el título correspondiente de la muestra examinada por interpolación.
NOTA: Hay que hacer una curva estándar por cada ciclo.
Si la D.O. de una muestra u calibrador es más de 2,0, leer a 405 nm y multiplicar el valor por 3.

Conversión de las D.O. en IU/mL
El IgG anti-CMV de cada muestra puede ser expresado en unidades arbitrarias (EU/mL) o en IU/mL (anti CMG IgG WHO standard), interpolando los valores en DO de los 6 calibradores y comparando el valor en DO de la muestra con la curva obtenida. La Tabla 1 indica la conversión entre EU/ml y UI/ml.

Tab. 1: Valor de los calibradores en unidades arbitrarias e internacionales

	EU/mL	IU/mL
Calibrador 0	0	0
Calibrador 1	5	0.5
Calibrador 2	10	1
Calibrador 3	50	5
Calibrador 4	100	10
Calibrador 5	200	20

El grado de inmunidad puede ser interpretado como sigue:
- *INMUNE*: cuando la concentración de IgG Cytomegalovirus en la muestra es > 12 EU/mL o 1.2 IU/mL
- *NO INMUNE*: cuando la concentración de IgG anti-Cytomegalovirus es < < 8 EU/mL o < 0.8 IU/mL.
- *DUDOSO*: cuando la concentración está entre los dos valores. En este caso se aconseja repetir el test por duplicado. Si el resultado permanece dudoso, recoger otra muestra de sangre después de 2 semanas.

Resultados Cualitativos
Calcular la proporción entre el valor de la D. O. de la muestra y la del Cut-off (Calibrador 2). La muestra se considera:
Positiva: cuando la proporción es > 1.2.
Dudosa: > 0.8 - < 1.2
Negativa: cuando la proporción es < 0.8.

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

12. LIMITACIONES

Las muestras recogidas la durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativas con este procedimiento.
La inactivación al calor del suero examinado no produce resultados erroneos en la determinación de las IgG anti Cytomegalovirus a diferencia de cuanto pasa con la determinación de las IgM; el nivel de las IgM anti-Cytomegalovirus tendría que ser determinado usando el kit
Platelia™ CMV IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.
El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de la historia del paciente u de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 23 muestras negativas al Cytomegalovirus, contenentes anticuerpos IgG contra virus como lo de la Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex, Sarampión, Mumps. En ningún caso la presenzia de tales anticuerpos afectaba el test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 264 muestras, 47 de las cuales fueron negativas y 217 positivas. Las muestras fueron analizadas con otro método inmunoenzimático comercial: se encontró un acuerdo del 100% entre los dos métodos.

El kit Platelia™ CMV IgG ofrece el 100% de sensibilidad y especificidad.

15. PRECISIÓN

Tab.2 Reproducibilidad intra-ensayo realizada sobre 3 lotes distintos

Cut Off n=21	***Lote N.104***	***Lote N. 105***	***Lote. N. 106***
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Tab.3 Ensayos realizados en series

Muestra	**EU/ml**			
	I serie	**II serie**	**III serie**	**CV%**
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	**POSSIBLES FUENTES DE ERROR**	**PRUEBA U ACCIONES**
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay.
2. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
3. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
4. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
5. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
6. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
7. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
8. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTS 72680

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI CYTOMEGALOVIRUS NEL SIERO UMANO



SOMMARIO

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI CYTOMEGALOVIRUS NEL SIERO UMANO.

2. INTRODUZIONE

Il cytomegalovirus è un herpes virus che si trasmette in stretto contatto interumano.
La maggior parte dei soggetti risulta infettata in modo asintomatico. Il virus, al contrario, è molto pericoloso nei pazienti immunodepressi nei quali può provocare la morte. Le donne sieronegative che contraggono la malattia durante la gravidanza la possono trasmettere al feto. Nel 95% dei casi questo avviene senza conseguenze ma nei neonati sintomatici si può avere ittero, epato-splenomegalia e ritardo psicomotorio. Per questo è molto importante conoscere lo stato immunitario della paziente ed osservare l'eventuale sieroconversione. Un aumento significativo nel titolo di IgG anti Cytomegalovirus suggerisce una infezione recente o una riattivazione di una infezione latente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
L'antigene, costituito da cytomegalovirus parzialmente purificato ed inattivato, viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.
Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane coniugate con perossidasi di rafano.
Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.
Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame. Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico la colorazione gialla che ne risulta può essere facilmente letta in un lettore per micropiastre ELISA.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

- Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE *MICROPIASTRA. 12 x 8 pozzetti sensibilizzati con Cytomegalovirus.*
Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (C seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CAL *CALIBRATORI. 5 x 1,6 mL*
Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-CMV IgG , in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione. I valori possono essere espressi sia come UI/ml che come EU/ml (vedere punto 11 per tabella di conversione). Il Calibratore 2 (1 UI/ml o 10 EU/mL) corrisponde al cut-off e può essere usato per l'analisi qualitativa. I valori dei calibratori sono 0.5, 1, 5, 10, 20 UI/ml ottenuti per titolazione contro il "**Proposed International Standard – WHO**" .
Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ *CONIUGATO. 1 x 16 mL.*
Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi in tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL IgG - *IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910). 1 x 1.6 mL.* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Contenuto: Siero umano, privo di anticorpi anti-CMV IgG, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione (Calibratore 0).

WASH BUF 10x *TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 1 x 100 mL.* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .
Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 50x *DILUENTE 50X (PF93601). 1 x 4.5 mL.* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Da utilizzare per la diluizione dei campioni.
Contenuto: Soluzione proteica concentrata 50x, con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%.
Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:50 nel tampone di lavaggio per avere il diluente pronto all'uso.

SUBS TMB *SUBSTRATO (PF93619). 12 mL. Pronto all'uso.* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H_2O_2 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 16 mL.* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Soluzione di H_2SO_4 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).
BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.
- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10.100.1000 UL di soluzione

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI RAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.
La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull' etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	6 SETTIMANE 2/8°C busta di polietilene
CALIBRATORI	6 SETTIMANE 2/8°C
CONIUGATO	6 SETTIMANE 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C ; 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	p. uso 2 settimane 2/8°C
WASH BUFFER	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
STOP SOLUTION	fino alla scadenza a 2/8°.

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Attenzione:
Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.

2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
   a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
   b) Il coniugato contiene fenolo
   c) Il substrato è acido
   d) I calibratori contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi: diluire con molta acqua per la sua eliminazione

   Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**

   Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
    - installazione e requisiti particolari
    - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
    - specifiche del produttore e performance dello strumento
    - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a –20°C , può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti . I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.
Campioni fortemente lipemici, itterici, emolizzati o inquinati non dovrebbero essere utilizzati., I campioni possono essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione .
Il test non è applicabile a plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale
- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Rinsing Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Preparare il volume richiesto di diluente dei campioni aggiungendo una parte del Diluent 50x a 49 parti del tampone di lavaggio diluito (esempio 2 mL + 98 mL).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i calibratori possibilmente in duplicato (100 µL per pozzetto). Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL del substrato.
Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono OD superiori a 2.000.

9. Schema del protocollo di prova per CYTOMEGALOVIRUS IgG

Tecnica manuale

STEP 1 Mettere 100 µL di siero diluito / calibratori nei pozzetti dello strip.

Incubare 45 min. a 37°C

Lavare 4 volte (300 µl)

STEP 2 Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto

Incubare 45 min. a 37°C

Lavare 4 volte (300 µl)

STEP 3 Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto

Incubare 15 min. a t.a.

STEP 4 Aggiungere 100 µL di Stop Solution

Leggere la D.O. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

1. **CONTROL -** (Calibratore 0): la densità ottica (D.O.) del controllo negativo deve essere < 0,6 volte la D.O. del Calibratore 2.
2. La D.O. del Calibratore 2 deve essere ≥ 0.2 a 450 nm; >= 0.16 a 450/620 nm
3. La D.O. dello Calibratore 5 deve essere superiore a 1,2.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

RISULTATI QUANTITATIVI

Riportare in grafico le D.O. dei calibratori, sottratte dalla D.O. del bianco (<= 0.150), in funzione del titolo di ciascun calibratore.
Ottenere il titolo corrispondente del campione in esame per interpolazione.
NOTA: Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.
Se la D.O. di un campione o calibratore è superiore a 2,0, leggere a 405 nm e moltiplicare il valore per 3.

Conversione delle D.O. in unità/mL

Le IgG anti-CMV di ciascun campione possono essere espresse in unità arbitrarie (EU/mL) o in IU/mL (anti CMG IgG WHO standard), interpolando i valori in D.O. dei 6 calibratori e confrontando il valore in D.O. del campione con la curva così ottenuta.La Tabella 1 riporta la conversione tra EU/ml e UI/ml.

Tab. 1: Valore dei calibratori in unità arbitrarie e internazionali

	EU/mL	IU/mL
Calibrator 0	0	0
Calibrator 1	5	0.5
Calibrator 2	10	1
Calibrator 3	50	5
Calibrator 4	100	10
Calibrator 5	200	20

Il grado di immunità può essere interpretato come segue:
IMMUNE: quando la concentrazione di IgG Cytomegalovirus nel campione è > 12 EU/mL o 1.2 IU/mL
NON IMMUNE: quando la concentrazione di IgG anti-Cytomegalovirus è < 8 EU/mL o < 0.8 IU/mL.
DUBBIO: quando il valore è compreso fra i due valori. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato.

RISULTATI QUALITATIVI

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-Off (Calibratore 2). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2
Dubbio: > 0.8 - < 1.2
Negativo: quando il rapporto è < 0.8

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.
L'inattivazione al calore del siero in esame non produce risultati erronei nella determinazione delle IgG anti Cytomegalovirus a differenza di quanto accade nella determinazione delle IgM; Il livello delle IgM anti-Cytomegalovirus dovrebbe essere determinato usando il kit
Platelia™ CMV IgM. Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG.
Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti dalla storia del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 23 campioni negativi al Cytomegalovirus , contenenti anticorpi IgG contro virus quali quello della Rubella, Epstein Barr.,Herpes Simplex , Morbillo Parotite. In nessun caso la presenza di tali anticorpi influenzava il test.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 264 campioni, di cui 47 risultavano negativi e 217 positivi. I campioni sono stati analizzati con un altro metodo immunoenzimatico commerciale: si è trovato un accordo del 100% fra i due metodi.

Il kit Platelia™ CMV IgG ha specificità e sensibilità del 100%.

15. PRECISIONE

Tab.2 Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

Cut Off n=21	*Batch. N. 104*	*Batch. N. 105*	*Batch. N. 106*
O.D.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Tab.3 Precisione tra sedute

	EU/ml			
Campione	**I run**	**II run**	**III run**	**CV%**
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBLI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE	- Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) - Marcado CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro) - Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro)
IVD	- Pour diagnostic *in vitro* - Para diagnóstico *in vitro* - Per uso diagnostico *in vitro*
	- Fabricant - Fabricante - Produttore
	- Limites de températures de stockage - Temperatura limite - Limiti di temperatura di conservazione
i	- Consulter le mode d'emploi - Consulte la instrucción para el uso - Consultare le istruzioni per uso

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE **0459**
12/2004

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTES 72680

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ANTICORPOS DE CLASSE IgG AO CITOMEGALOVIRUS NO SORO HUMANO PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO



Português

ÍNDICE

1. FINALIDADE DO DISPOSITIVO

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ANTICORPOS DE CLASSE IgG AO CITOMEGALOVÍRUS NO SORO HUMANO PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O citomegalovírus é um vírus de herpes transmitido por contacto humano próximo. Na maioria dos casos não são visíveis quaisquer sintomas de infecção. No entanto, o vírus é muito perigoso, podendo revelar-se fatal em doentes imunodeprimidos. As doentes seronegativas que sejam infectadas durante a gravidez podem transmitir a doença ao feto. Em 95% dos casos, tal infecção ocorre sem sintomas, mas alguns recém-nascidos podem apresentar icterícia, hepatosplenomegalia e atraso no desenvolvimento psicomotor. Por esta razão é de grande importância determinar o estado imune do doente e detectar qualquer seroconversão. Um aumento significativo no título de IgG anti-citomegalovírus é indicador de infecção recente ou reactivação de uma infecção latente.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste baseia-se na técnica ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) (1-7).
O antigénio, composto de citomegalovírus inactivado e parcialmente purificado, liga-se à fase sólida (tiras de 8 poços). As imunoglobulinas específicas ligam-se ao antigénio por incubação com o soro humano diluído.
Após lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, procede-se à incubação com o conjugado, composto de anticorpos monoclonais IgG humanos, conjugados com peroxidase de rábano.
O conjugado não ligado é eliminado e o substrato de peroxidase adicionado.
A cor azul que se desenvolve é proporcional ao título de anticorpos específicos presentes na amostra de soro. Quando a reacção enzimática é interrompida por adição de uma solução de ácido sulfúrico, a cor amarela que se desenvolve pode ser facilmente lida utilizando um leitor de microplacas.

4. CONTEÚDO DO DISPOSITIVO E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- O dispositivo contém reagentes suficientes para 96 determinações.

Estabilizar à temperatura ambiente antes de usar.

MT PLATE *MICROPLACA. 12 x 8 poços revestidos com citomegalovírus.*
Utilização: abrir a embalagem do lado oposto ao código (C mais número de lote) que pode ser útil para fins de identificação; retirar, da embalagem de alumínio, o suporte e as tiras a usar, e colocar as tiras não utilizadas no saco de polietileno contendo sílica gel, expelir o ar e selar, pressionando o fecho.

CALIBRATORS *5 x 1.6 ml*
Conteúdo: Soro humano diluído contendo títulos específicos de anticorpos IgG anti-CMV, em tampão fosfato 0.01 mol/l com BSA 1% e azida de sódio 0.09%, líquido, pronto a usar sem diluição adicional. Os valores podem ser expressos em IU/ml ou EU/ml (ver tabela de conversão no parágrafo 11). O calibrador 2 (1 IU/ml ou 10 EU/ml) corresponde ao valor de *cut-off* e pode ser utilizado no teste qualitativo. Os calibradores têm os seguintes valores: 0.5, 1, 5, 10, 20 IU/ml, obtidos por titulação em comparação com a norma internacional proposta pela OMS, **“Proposed International Standard WHO”.**
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao título relativo de anticorpos.

CONJ *CONJUGADO. 1 x 16 ml*
Conteúdo: anticorpos monoclonais etiquetados com Peroxidase, em solução tampão de fosfato contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%. Pronto a usar sem diluição adicional.

CONTROL IgG - *CONTROLO IgG NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 ml* ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Conteúdo: Soro humano não contendo anticorpos IgG anti-CMV, diluído em tampão fosfato 0.01 mol/l, com BSA 1% e azida de sódio 0.09%, líquido, pronto a usar sem diluição adicional (Calibrador 0).
Estabilidade: O produto mantém-se estável até ao termo do prazo de validade, quando conservado fechado, à temperatura de 2/8°C.

WASH BUF 10x *TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603). 1 x 100 ml* ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Conteúdo: Solução salina tampão de fosfato, concentrada 10 vezes; contém Brij 0.5%.
Preparação: diluir o volume necessário 1:10 com água destilada, a fim de obter a solução tampão de lavagem, pronta a usar. Se forem visíveis cristais, estes deverão ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

SAMP DIL 50x *DILUENTE 50X (PF93601). 1 x 4.5 ml. Para diluição de amostras de soro.* ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Conteúdo: Solução proteica concentrada 50 vezes, com adição de fenol 0.05% e Bronidox 0.02%.
Preparação: Diluir o volume necessário 1:50 na solução tampão de lavagem, a fim de obter o diluente pronto a usar.

SUBS TMB *SUBSTRATO (PF93619). 12 ml. Pronto a usar.* ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/ml e peróxido hidrogénio 0.01% estabilizado em tampão de citrato 0.05 mol/l (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M *SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602). 1 x 16 ml.* ***INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES***
H_2SO_4 0.3 mol/l, em solução pronta a usar.

FITA ADESIVA (2)
SACO DE POLIETILENO (1)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS.
- Incubadora a 37°C
- Leitor de microplacas (comprimento de onda 450 ou 450/620 nm e 405 nm, com linearidade até DO >= 2000)
- Aparelho de lavagem de microplacas (de preferência), capaz de distribuir volumes entre 225-375 µl
- Água destilada ou desionizada
- Recipientes de vidro habitualmente utilizados em laboratório: provetas, tubos de ensaio, etc.
- Micropipetas para recolha rigorosa de 10, 100, 1000 µl de solução
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipocloreto de sódio (5%)
- Contentores para recolha de materiais potencialmente infecciosos
- Papel absorvente.

5. CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados à temperatura de 2/8°C.
O prazo de validade está indicado em cada componente e na etiqueta da respectiva embalagem.

Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

REAGENTE	**CONDIÇÕES**
Microplaca	6 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Calibradores	6 semanas a 2/8°C
Conjugado	6 semanas a 2/8°C
Substrato	até ao termo do prazo de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C; guardar ao abrigo da luz
Diluente de Amostras	pronto a usar, 2 semanas a 2/8°C
Tampão de Lavagem	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C
Solução de Paragem	até ao termo do prazo de validade a 2/8°C

6. PRECAUÇÕES

PARA UTILIZAÇÃO EXCLUSIVA NO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este dispositivo contém materiais de origem humana que foram testados e forneceram uma resposta negativa pelos métodos aprovados pela FDA, quanto à presença de HbsAg e anticorpos anti-HIV-1, anti-HIV-2 e anti-HCV. Uma vez que nenhum teste de diagnóstico pode fornecer garantia absoluta quanto à ausência de agentes infecciosos, todo o material de origem humana deverá ser considerado como potencialmente infeccioso. No manuseamento de materiais de origem humana todas as precauções normalmente adoptadas na prática laboratorial deverão ser cumpridas.

Informações quanto à Saúde e Segurança

1. Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis e óculos de protecção durante o manuseamento de amostras e a realização do ensaio. Lavar cuidadosamente as mãos quando terminar.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias perigosas ou irritantes:
   a) a Solução Tampão de Lavagem contém detergentes
   b) o conjugado contém fenol
   c) o substrato é ácido
   d) os controlos contêm 0.09% de Azida de Sódio que podem reagir com o chumbo e o cobre das canalizações, formando depósitos altamente explosivos de azidas metálicas; diluir com água abundante para eliminar.

   Se qualquer dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lavar a zona afectada com água abundante.
3. Os dispositivos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferencialmente recomendado é a esterilização em autoclave durante 1 h a 121°C; os elementos descartáveis devem ser esterilizados em autoclave ou incinerados.
4. O ácido sulfúrico necessário para a Solução de Paragem e o ácido clorídrico utilizado na lavagem dos recipientes de vidro são corrosivos e deverão ser manuseados com os devidos cuidados. Em caso de contacto com a pele ou os olhos, lavar com água abundante.
5. Os ácidos neutralizados e outros resíduos líquidos deverão ser descontaminados, adicionando um volume de hipocloreto de sódio suficiente para obter uma concentração final de, pelo menos, 1.0%. Para assegurar uma descontaminação eficaz poderá ser necessária uma exposição de 30 minutos ao hipocloreto de sódio a 1%.
6. Qualquer derramamento de materiais potencialmente infecciosos deverá ser eliminado imediatamente por meio de papel absorvente e a área contaminada deverá ser lavada com, por exemplo, hipocloreto de sódio 1.0%, antes de se prosseguir com a actividade. Não aplicar hipocloreto de sódio sobre zonas derramadas com ácido, antes de secar primeiro toda a área. Os materiais utilizados para a limpeza de derramamentos, incluindo as luvas, devem ser eliminados em contentor de resíduos biológicos potencialmente perigosos. Não esterilizar materiais que contenham hipocloreto de sódio.

Precauções analíticas

1. Todos os reagentes e amostras deverão ser estabilizados à temperatura ambiente (18-30°C) antes de serem usados. Imediatamente após a utilização, levar de novo os reagentes à temperatura de conservação recomendada. **É importante trabalhar à temperatura correcta. O termóstato não deverá situar-se abaixo de 35°C ou acima de 39°C.** O envelope contendo as tiras só deve ser aberto depois de, pelo menos, meia hora à temperatura ambiente.
2. Não utilizar os reagentes após o prazo de validade indicado. A contaminação microbiológica dos reagentes deve ser evitada, já que pode reduzir o tempo de vida útil do produto e dar origem a resultados erróneos.
3. Não modificar o Procedimento de Teste ou substituir reagentes de outros fabricantes ou outros lotes, a menos que o reagente apresente a indicação de intermutável. Não reduzir qualquer dos tempos de incubação recomendados.
4. Os recipientes em vidro utilizados com os reagentes deverão ser meticulosamente lavados com ácido clorídrico 2M e depois enxaguados com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
5. Não expor os reagentes a uma luz intensa ou a vapores de hipocloreto durante o armazenamento ou durante as operações de incubação.
6. Não permitir que os poços sequem durante o procedimento de teste.
7. Evitar cuidadosamente qualquer contaminação cruzada dos reagentes. É importante que as pipetas sejam exclusivamente dedicadas ao uso de cada um dos reagentes.
8. Evitar tocar ou salpicar o rebordo do poço com conjugado. Não tentar eliminar soprando sobre as microplacas.
9. Os imunoensaios enzimáticos podem ocasionalmente exibir um “efeito de orla” que deve ser minimizado aumentando a humidade durante as operações de incubação. As placas devem ser cobertas com a respectiva tampa e incubadas a 37°C, em banho de água com um suporte ou flutuador para suportar as placas, se necessário, ou numa incubadora. Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações é favor consultar o manual de instruções apropriado. Não devem ser utilizadas incubadoras de CO_2.
10. Assegurar que o fundo da placa se apresenta limpo e seco e que não são visíveis quaisquer bolhas à superfície do líquido, antes de proceder à leitura da placa.
11. O uso de amostras altamente hemolizadas, soros não completamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.

12. Para cada instrumento utilizado recomenda-se a leitura cuidadosa das respectivas instruções do fabricante, por forma a obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
    - instalação e requisitos especiais
    - princípios de funcionamento, instruções, precauções e riscos
    - especificações do fabricante e desempenho do instrumento
    - assistência técnica e manutenção.

7. TIPO E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra é composta pelo soro recolhido da forma habitual a partir da veia e submetido a tratamento com todas as precauções ditadas pelas boas práticas de laboratório. O soro fresco pode ser conservado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais prolongados a –20°C, podendo ser congelado um máximo de 3 vezes. As amostras descongeladas devem ser cuidadosamente agitadas antes de usar. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana, podendo conduzir a resultados erróneos.
As amostras fortemente lipémicas, ictéricas ou contaminadas deverão ser evitadas. Se não for possível obter uma nova amostra, aquelas deverão ser clarificadas por filtração (0.45 µm) ou centrifugação.
O plasma humano não pode ser utilizado no teste.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica Manual

- Preparar o número de tiras necessárias.
- Preparar a solução de lavagem, diluindo o Tampão de Lavagem 10x (100 ml + 900 ml H_2O).
- Preparar o diluente necessário para as amostras, adicionando 1 parte de Diluente 50x a 49 partes da solução tampão de lavagem diluída (exemplo: 2 ml + 98 ml do tampão de lavagem diluído).

Diluir as amostras 1:101, distribuindo 10 µL de soro em 1 ml de diluente. Distribuir 100 µl de cada amostra diluída por poço (recomenda-se a realização do teste em duplicado). Colocar os calibradores NÃO DILUÍDOS (se possível em duplicado) numa tira (100 µl em cada poço). Deixar um poço vazio, preparado utilizando 100 µl da mistura de substrato.
Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 45 minutos a 37°C. Depois de quatro lavagens durante 30 segundos (300 µl), adicionar 100 µl do conjugado a cada poço e incubar de novo durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com a película de protecção. A placa é novamente lavada 4 vezes, como acima descrito. Finalmente, distribuir o substrato, 100 µl/poço.
Após 15 minutos à temperatura ambiente, parar a reacção enzimática com 100 µl de Solução de Paragem.
A absorvência (D.O.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm, no prazo de 30 min. Repetir a leitura a 405 nm caso existam DO superiores a 2000.

9. Esquema do Procedimento de Teste para o CITOMEGALOVÍRUS IgG

Técnica Manual

PASSO 1 Colocar 100 µl de amostra diluída/controlos nos poços das tiras
Incubar durante 45 min. a 37°C
Lavar 4 vezes (300 µl)

PASSO 2 Adicionar 100 µl de conjugado em cada poço
Incubar durante 45 min. a 37°C
Lavar 4 vezes (300 µl)

PASSO 3 Adicionar 100 µl de Substrato em cada poço
Incubar durante 15 min. à temperatura ambiente

PASSO 4 Adicionar 100 µl de Solução de Paragem
Proceder à leitura da absorvência a 450 nm no prazo de 30 min

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

1. **CONTROL -** (Calibrador 0): a D.O. do controlo negativo deve ser < 0.6 vezes a D.O. do Calibrador 2.
2. A D.O. do Calibrador 2 deve ser ≥ 0.2 a 450 nm; >= 0.16 a 450/620 nm.
3. A D.O. do Calibrador 5 deve ser superior a 1.2.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADOS QUANTITATIVOS

Registar a D.O. dos calibradores num gráfico, depois de subtrair a D.O. do elemento vazio. O título correspondente da amostra de teste pode ser obtido por extrapolação.
NOTA: É necessário efectuar uma curva standard para cada execução.
Se a D.O. de qualquer amostra ou calibrador se situar acima de 2.0, efectuar a leitura a 405 nm e multiplicar o valor por 3.

Conversão da D.O. em unidades/ml
O anti-citomegalovírus IgG pode ser expresso em EU/ml (unidades arbitrárias) ou em IU/ml (anti CMV IgG standard, proposto pela OMS), extrapolando os resultados dos 6 calibradores e comparando a D.O. da amostra com a curva obtida.

Quadro 1: Valores dos Calibradores em unidades arbitrárias e unidades internacionais

	EU/ml	IU/ml
Calibrador 0	0	0
Calibrador 1	5	0.5
Calibrador 2	10	1
Calibrador 3	50	5
Calibrador 4	100	10
Calibrador 5	200	20

O grau de imunidade pode ser interpretado da seguinte forma:

IMUNE: quando o título de anti-citomegalovírus IgG na amostra é > 12 EU/ml ou 1.2 IU/ml

NÃO IMUNE: quando o título de anti-citomegalovírus é < 8 EU/ml o < 0.8 IU/ml

DUVIDOSO: se o resultado se situa entre os dois valores. Neste caso, aconselha-se repetir o teste em duplicado.

RESULTADOS QUALITATIVOS
Calcular a razão entre o valor de D.O. da amostra e o valor *cut-off* (Calibrador 2). A amostra é considerada:
Positiva: se a razão for > 1.2
Duvidosa: > 0.8 - < 1.2
Negativa: se a razão for < 0.8

Em caso de um resultado duvidoso, o teste deve ser repetido. Se, mesmo assim, se mantiver duvidoso, recolher uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda da infecção, quando existirem apenas anticorpos IgM, pode ser negativa segundo este procedimento.
A inactivação térmica do soro de teste não dá origem a resultados erróneos na determinação de anti-CMV IgG, como acontece com o anti-CMV IgM.
O título de citomegalovírus IgM deve ser determinado utilizando o dispositivo Platelia™ CMV IgM. Alternativamente, uma segunda amostra de soro, obtida 8-14 dias mais tarde, deverá ser testada em paralelo para determinar um aumento no título de anticorpos IgG.
O resultado do teste deve ser utilizado em conjunto com as informações disponíveis a partir da avaliação da história do processo ou de outros procedimentos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 23 amostras que eram negativas a CMV, mas continham anticorpos IgG contra vírus tais como Rubéola, Epstein Barr, Herpes Simplex, Sarampo ou Papeira. Em nenhum caso a presença destes anticorpos influenciou o teste.

14. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO DIAGNÓSTICO

Num ensaio clínico realizado num laboratório hospitalar, foram analisadas 264 amostras, das quais 47 comprovadas negativas e 217 positivas. As amostras foram analisadas com outro método imunoenzimático existente no mercado: registou-se uma concordância de 100% entre os dois métodos, tanto no caso das amostras positivas como nas negativas.

O dispositivo Platelia™ CMV IgG oferece 100% de sensibilidade e especificidade.

15. PRECISÃO

Quadro 2 Precisão intra-série efectuada em 3 lotes diferentes

Cut Off n=21	*Lote. N.104*	*Lote. N. 105*	*Lote. N. 106*
D.O.	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

Quadro 3 Precisão inter-séries

	EU/ml			
Amostra	**série I**	**série II**	**série III**	**CV%**
n.1	12.6	17.5	17.6	18
n.2	78.5	87.5	96.3	10

16. GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEL ORIGEM	TESTE OU ACÇÃO
Série não válida (totalmente negativa)	Um ou mais reagentes não adicionados, ou incluídos na sequência errada	Verificar de novo o procedimento Verificar se existem soluções que não tenham sido utilizadas. Repetir o teste.
	Placa não reactiva	Verificar o código da embalagem que contém a placa (ver qual o código correcto, no parágrafo 4 do folheto de instruções).
		Verificar se a placa não usada apresenta humidade (o dessecante de sílica gel deve ser de cor amarela clara). Repetir o teste.
Série não válida (totalmente positiva)	Contaminação do substrato	Tirar nova alíquota do substrato.
	Lavagem inadequada	Verificar se o aparelho de lavagem está a funcionar correctamente
Fraca precisão	Lavagem incompleta dos poços	Verificar se o aparelho de lavagem está a funcionar correctamente
	Aspiração incorrecta dos poços	Verificar se o aparelho de lavagem está a funcionar correctamente
	Erro de pipetagem	Verificar o funcionamento da pipeta
	Adição de reagente demasiado lenta	Evitar deixar secar a placa após a operação de lavagem. Adicionar imediatamente os reagentes.
	Presença de bolhas	Evitar a formação de bolhas durante a pipetagem.
	Passagem óptica não limpa	Verificar se a fonte de luz e o detector do aparelho estão sujos. Limpar o fundo da placa com um tecido macio.
Revelação de cor inadequada	Tempos de incubação ou temperatura incorrectos	Verificar os controlos de temperatura e tempo
		Respeitar as instruções de utilização recomendadas.
	Volume incorrecto de substrato adicionado à placa	Verificar o funcionamento da pipeta.

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).
8. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE	- Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro)
IVD	- Para uso em diagnóstico *in vitro*
	- Fabricante
	- Limites de temperatura de armazenamento
	- Consulte o folheto informativo

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE **0459**
12/2004

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TEST 72680

IMMUNOENZYMATISK METOD FÖR KVALITATIV OCH KVANTITATIV BESTÄMNING AV IgG-ANTIKROPPAR MOT CYTOMEGALOVIRUS I HUMANT SERUM



Svensk

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. ANVÄNDNINGSOMRÅDE

IMMUNOENZYMATISK METOD FÖR KVALITATIV OCH KVANTITATIV BESTÄMNING AV IgG-ANTIKROPPAR MOT CYTOMEGALOVIRUS I HUMANT SERUM

2. ÖVERSIKT AV TEST

Cytomegalovirus är ett herpesvirus som överförs vid nära kontakt mellan människor. I de flesta fall visas inga symtom på infektion. Viruset är emellertid mycket farligt och kan vara livshotande hos patienter med nedsatt immunförsvar. Serumnegativa kvinnliga patienter som infekteras under graviditeten kan överföra sjukdomen till fostret. I 95 % av fallen inträffar det utan symtom men vissa nyfödda får gulsot, hepatosplenomegali och försenad psykomotorisk utveckling. Därför är det mycket viktigt att bestämma patientens immunstatus och detektera eventuell serokonversion. En signifikant ökning av anti-cytomegalovirus IgG-titern tyder på en nyligen förvärvad infektion eller återaktivering av en latent infektion.

3. TESTPRINCIP

Testet baseras på ELISA-teknik (enzymlänkade immunologiska mätmetoder) (1–7).
Antigenet, som består av delvis renat och inaktiverat cytomegalovirus, binds till den fasta fasen (remsor med 8 brunnar). De specifika immunoglobulinerna binds till antigenet genom inkubering med utspätt humant serum.
Efter tvättning, då proteiner som inte har reagerat avlägsnas, utförs inkubering med konjugatet som består av pepparrotsperoxidas-konjugerade humana IgG-monoklonala antikroppar.
Det obundna konjugatet elimineras och peroxidassubstrat tillsätts.
Den blå färg som framträder är proportionell till koncentrationen av specifika antikroppar som förekommer i serumprovet. När den enzymatiska reaktionen avbryts vid tillsats av svavelsyralösning, läses den framträdande gula färgen av med en avläsare för mikroplattor.

4. INNEHÅLL OCH REAGENSBEREDNING

– Reagenserna räcker till 96 bestämningar.

Låt uppnå rumstemperatur före användning.

MT PLATE *MIKROPLATTA. 12 x 8 brunnar belagda med cytomegalovirus.*
Användning: Öppna förpackningen i motsatt ände i förhållande till koden (C följt av partinumret) eftersom den behövs vid identifiering. Ta ut stödramen och de remsor som ska användas ur folieförpackningen och lägg de oanvända remsorna i polyetenpåsen med kiselgel, pressa ut luften och förslut påsen.

CALIBRATORS *5 x 1,6 ml*
Innehåll: Utspätt humant serum som innehåller kända koncentrationer av anti-CMV IgG-antikroppar, i fosfatbuffert 0,01 mol/l med BSA 1 % och natriumazid 0,09 %, flytande form, bruksfärdigt, behöver inte spädas ytterligare. Värdet kan uttryckas i IU/ml eller EU/ml (en omvandlingstabell finns i avsnitt 11). Kalibrator 2 (1 IU/ml eller 10 EU/ml) motsvarar gränsvärdet och kan användas i det kvalitativa testet. Kalibratorerna har följande värden: 0,5, 1, 5, 10, 20 IU/ml, som erhållits genom titrering enligt **”WHO International Standard”.**
Färg: Färgen på kalibratorerna är proportionell mot den relativa antikroppstitern.

CONJ *KONJUGAT. 1 x 16 ml.*
Innehåll: Monoklonala antikroppar märkta med peroxidas, i fosfatbuffertlösning som innehåller fenol 0,05 % och bronidox 0,02 %. Bruksfärdigt, behöver inte spädas ytterligare.

CONTROL IgG - *IgG-NEGATIV KONTROLL (PF93910) 1 x 1,6 ml* ***UTBYTBAR MELLAN PARTIER***
Innehåll: Humant serum som inte innehåller anti-CMV IgG-antikroppar, utspätt i fosfatbuffert 0,01 mol/l med BSA 1 % och natriumazid 0,09 %, flytande form, bruksfärdigt, behöver inte spädas ytterligare (kalibrator 0).
Hållbarhet: Produkten är hållbar till utgångsdatumet om den förvaras oöppnad vid 2/8°C.

WASH BUF 10x *TVÄTTBUFFERT 10X (PF93603). 1 x 100 ml* ***UTBYTBAR MELLAN PARTIER***
Innehåll: Fosfatbuffrad saltlösning, koncentrerad 10 gånger; innehåller Brij 0,5 %.
Beredning: Späd önskad volym 1:10 med destillerat vatten för att erhålla en bruksfärdig tvättbuffert. Om kristaller förekommer ska de lösas i 37 °C före spädning.

SAMP DIL 50x *UTSPÄDNINGSMEDEL 50X (PF93601). 1 x 4,5 ml. För spädning av serumprover.* ***UTBYTBAR MELLAN PARTIER***
Innehåll: Proteinlösning, koncentrerad 50 gånger med tillsats av fenol 0,05 % och bronidox 0,02 %.
Beredning: Späd önskad volym 1:50 i tvättbufferten för att erhålla ett bruksfärdigt utspädningsmedel.

SUBS TMB *SUBSTRAT (PF93619). 12 ml. Färdigt att använda.* ***UTBYTBAR MELLAN PARTIER***
Innehåll: Tetrametylbensidin 0,26 mg/ml och väteperoxid 0,01 % stabiliserat i citratbuffert 0,05 mol/l (pH 3,8).

H_2SO_4 0,3 M *STOPPLÖSNING (PF93602). 1 x 16 ml.* ***UTBYTBAR MELLAN PARTIER***
H_2SO_4 0.3 mol/l, i bruksfärdig lösning.

SJÄLVHÄFTANDE FOLIE (2)
POLYETENPÅSE (1)

NÖDVÄNDIGT MEN EJ BIFOGAT MATERIAL.
- Inkubator, 37 °C
- Avläsare för mikroplattor (våglängd 450 eller 450/620 och 405 nm, med linjäritet upp till OD >= 2 000)
- Tvättanordning för mikroplattor (rekommenderas) för fördelning av 225–375 µl
- Destillerat eller avjoniserat vatten
- Normala laboratorieglasvaror: mätglas, provrör osv.
- Mikropipetter för exakta volymer: 10, 100 och 1 000 µl
- Engångshandskar
- Timer
- Natriumhypokloritlösning (5 %)
- Behållare för potentiellt smittfarligt material
- Absorberande pappersduk

5. REAGENSFÖRVARING OCH -HÅLLBARHET
Reagenserna måste förvaras vid 2–8 °C.
Utgångsdatumet anges angivet på förpackningens etikett och på varje komponent i förpackningen.

Reagenserna har begränsad hållbarhet sedan de öppnats och/eller beretts

REAGENS	**HÅLLBARHET**
Mikroplatta	6 veckor vid 2–8 °C, polyetenpåse
Kalibratorer	6 veckor vid 2–8 °C
Konjugat	6 veckor vid 2–8 °C
Substrat	fram till utgångsdatumet vid 2–8 °C, 1 vecka vid 15–30 °C; förvaras mörkt
Provutspädningsmedel	färdigt att använda, 2 veckor vid 2–8 °C
Tvättbuffert	2 veckor i 2–8 °C, 5 dagar vid 15–30 °C
Stopplösning	fram till utgångsdatumet vid 2–8 °C

6. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

ENDAST FÖR *IN VITRO*-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.

Testkitet innehåller material av humant ursprung som har testats med FDA-godkända metoder och gett negativt svar för förekomst av HbsAg och för anti-HIV-1, anti-HIV-2 och anti-HCV-antikroppar. Eftersom inget diagnostiskt test med säkerhet kan garantera frånvaro av smittsamma ämnen, måste allt material av humant ursprung hanteras som potentiellt smittsamt. Alla normala försiktighetsåtgärder enligt god laboratoriesed ska följas när material av humant ursprung hanteras.

Hälso- och säkerhetsinformation

1. Pipettera inte med munnen. Bär engångshandskar och ögonskydd när du hanterar prover och utför analys. Tvätta händerna noga när du är klar.
2. Följande reagenser innehåller låga koncentrationer av skadliga eller irriterande ämnen:
   a) Tvättbufferten innehåller rengöringsmedel
   b) Konjugatet innehåller fenol
   c) Substratet är surt
   d) Kontrollerna innehåller 0,09 % natriumazid. Spola med stora mängder vatten om kontrollerna hälls ut i avloppet, eftersom natriumazid kan reagera med bly- och kopparrör och bilda explosiva metallazider.

   Om någon av reagenserna kommer i kontakt med huden eller ögonen ska området tvättas mycket noga med vatten.
3. Utrustning som inte är engångsutrustning ska steriliseras efter användning. Autoklav 1 timme vid 121 °C är den metod som rekommenderas; engångsutrustning ska autoklaveras eller förbrännas.
4. Svavelsyra, som krävs för stopplösning, och saltsyra, som används vid tvättning av glasvaror, är frätande och ska hanteras varsamt. Tvätta noggrant med vatten om de kommer i kontakt med huden eller ögonen.
5. Neutraliserad syra och annat vätskeavfall ska dekontamineras genom tillsats av natriumhypoklorit i sådan mängd att en slutlig koncentration på minst 1,0 % erhålls. En effektiv dekontaminering kan kräva 30 minuters exponering för 1-procentig natriumhypoklorit.
6. Utspillt material som är potentiellt smittfarligt ska omedelbart avlägsnas med en absorberande pappershandduk och området därefter torkas av med exempelvis 1-procentig natriumhypoklorit. Natriumhypoklorit får inte användas på spill som innehåller syra, om inte området först torkas torrt. Material som används för upptorkning av spill, inklusive handskar, ska hanteras som potentiellt smittfarligt avfall. Material som innehåller natriumhypoklorit får inte autoklaveras.

Analytiska försiktighetsåtgärder

1. Låt reagenserna och proverna uppnå rumstemperatur (18–30 °C) före användning. Ställ tillbaka reagenserna i rekommenderad förvaringstemperatur direkt efter användning. **Det är viktigt att arbeta i rätt temperatur. Kontrollera att termostaten inte står lägre än 35 °C eller högre än 39 °C.** Öppna förpackningen med remsor efter minst en halvtimme i rumstemperatur.
2. Använd inte reagenserna efter utgångsdatumet. Mikrobiologisk kontaminering av reagenser måste undvikas eftersom det kan minska produktens livslängd och orsaka felaktiga resultat.
3. Gör inga ändringar i testproceduren och använd inte reagenser från andra tillverkare eller andra partier om inte reagenset uttryckligen är utbytbart. Förkorta inte någon av de rekommenderade inkuberingstiderna.
4. Alla glasvaror som ska användas till reagenserna ska tvättas noggrant med 2M saltsyra och därefter sköljas med destillerat vatten eller högkvalitativt avjoniserat vatten.
5. Reagenserna får inte exponeras för starkt ljus eller hypokloritånga vid förvaring eller när de inkuberas.
6. Låt inte brunnarna torka medan analysen pågår.
7. Se till att reagenserna inte korskontamineras. Det är viktigt att varje pipett används till endast ett reagens.
8. Se till att konjugat inte kommer i kontakt med eller spills på brunnens kant. Blås inte på mikroplattorna.
9. Vid immunologiska enzymanalyser kan brunnarna längst ut på mikroplattan ibland ge felaktiga resultat. Effekten kan minimeras genom att fuktigheten ökas under inkuberingen. Plattorna måste täckas över med lock och inkuberas i 37 °C antingen i vattenbad med rack eller flöte som håller plattorna vid behov, eller i en inkubator. Plattorna kan också inkuberas i ett godkänt analysinstrument. I respektive användarmanual finns mer information. CO_2 –inkubatorer får inte användas.
10. Försäkra dig om att plattans botten är ren och torr och att inga bubblor förekommer på vätskeytan innan plattan läses av.
11. Användning av starkt hemolyserade prover, ofullständigt koagulerat serum eller prover som är mikrobiellt kontaminerade kan ge felaktiga resultat.
12. Läs noggrant tillverkarens anvisningar för instrumentet för att få mer information om följande:
   – Installation och särskilda krav
   – Driftsprinciper, instruktioner, föreskrifter och risker
   – Tillverkarens specifikationer och instrumentets funktion
   – Service och underhåll

7. PROVTYPER OCH -FÖRVARING

Provet består av serum som tagits på normalt sätt från en ven och hanterats enligt god laboratoriesed. Färskt serum håller 4 dagar vid 2/8 °C. Det kan frysas under längre perioder i –20 °C och tinas högst 3 gånger. Tinade prover måste skakas försiktigt innan de används. Provets kvalitet kan påverkas allvarligt av mikrobiell kontaminering vilket leder till felaktiga resultat.
Starkt lipemiska, ikteriska eller kontaminerade prover ska undvikas. Om ett nytt prov inte kan erhållas ska sådana prover renas genom filtrering (0,45 µm) eller centrifugering.
Human plasma får inte användas i testet.

8. TESTPROCEDUR

Manuell metod

– Förbered önskat antal remsor.
– Bered tvättbufferten genom att späda tvättbuffertlösningen 10x (100 ml + 900 ml H_2O).
– Bered önskat spädningsmedel för prover genom att blanda 1 del utspädningsmedel 50x med 49 delar utspädd tvättbuffert (till exempel: 2 ml + 98 ml utspädd tvättbuffert).

Späd proverna 1:101 genom att tillsätta 10 µl serum i 1 ml utspädningsmedel. Fördela 100 µl av varje utspätt prov per brunn (test med dubbelprover rekommenderas). Placera OUTSPÄDDA kalibratorer (i dubbelprover om möjligt) i en remsa (100 µl i varje brunn). Lämna en brunn tom för blanken (tillsätt sedan endast 100 µl substratblandning).
Brunnarna täcks med skyddsfilm och inkuberas i 45 minuter vid 37 °C. Tvätta fyra gånger i 30 sekunder (300 µl). Tillsätt därefter 100 µl konjugat i varje brunn, täck med skyddsfilm och inkubera på nytt i 45 minuter vid 37 °C. Plattan tvättas på nytt 4 gånger enligt beskrivningen ovan. Till sist fördelas substratet, 100 µl/brunn.
Efter 15 minuter i rumstemperatur stoppas den enzymatiska reaktionen med 100 µl stopplösning.
Absorbansen (O.D.) avläses vid 450 eller 450/620 nm inom 30 minuter. Läs av igen vid 405 nm om OD-värdet är högre än 2 000.

9. Testschema för Platelia™ CMV IgG

Manuell metod

STEG 1 Tillsätt 100 µl utspädda prover/kontroller i remsans brunnar

Inkubera i 45 minuter vid 37 °C

Tvätta 4 gånger (300 µl)

STEG 2 Tillsätt 100 µl konjugat i varje brunn

Inkubera i 45 minuter vid 37 °C

Tvätta 4 gånger (300 µl)

STEG 3 Tillsätt 100 µl substrat i varje brunn

Inkubera i 15 minuter i rumstemperatur

STEG 4 Tillsätt 100 µl stopplösning

Läs av absorbansen vid 450 nm inom 30 minuter

10. TESTVALIDERING

1. **CONTROL -** (kalibrator 0): Den negativa kontrollens O.D.-värde måste vara < 0,6 gånger högre än O.D.-värdet för kalibrator 2.
2. O.D.-värdet för kalibrator 2 måste vara ≥ 0,2 vid 450 nm och >= 0,16 vid 450/620 nm.
3. O.D.-värdet för kalibrator 5 måste vara högre än 1,2.

11. UTVÄRDERING AV RESULTATEN

KVANTITATIVA RESULTAT

Rapportera kalibratorernas OD-värde på ett diagram sedan blankens OD-värde har subtraherats. Motsvarande titer för provet kan erhållas genom extrapolation.

ANMÄRKNING: En standardkurva måste göras för varje körning.

Om O.D.-värdet för ett av proverna/kalibratorerna är högre än 2,0 ska avläsningsvärdet vid 405 nm multipliceras med 3.

Omvandling av O.D.-värdet till enheter/ml

Anti-cytomegalovirus IgG kan uttryckas i EU/ml (arbiträra enheter) eller i IU/mL (enligt WHO-standard för anti-CMV IgG) genom att resultaten av de 6 kalibratorerna extrapoleras. Provets OD-värde jämförs sedan med den kurva som erhålls.

Tabell 1: Kalibratorvärden i arbiträra och internationella enheter

	EU/ml	IU/ml
Kalibrator 0	0	0
Kalibrator 1	5	0,5
Kalibrator 2	10	1
Kalibrator 3	50	5
Kalibrator 4	100	10
Kalibrator 5	200	20

Graden av immunitet kan tolkas på följande sätt:

IMMUN: när provets koncentration av anti-cytomegalovirus IgG > 12 EU/ml eller 1,2 IU/ml

ICKE-IMMUN: när koncentrationen anti-cytomegalovirus < 8 EU/ml eller < 0,8 IU/ml

TVEKSAMT: om resultatet ligger mellan de två värdena. I det här fallet rekommenderas att testet upprepas med dubbelprover.

KVALITATIVA RESULTAT

Beräkna kvoten mellan provets och gränsvärdets OD-värde (kalibrator 2). Provet anses som
positivt: om kvoten är > 1,2
tveksamt: > 0.8 - < 1.2
negativt: om kvoten är < 0,8

Upprepa testet om resultatet är tveksamt. Om det fortfarande är tveksamt ska ett nytt serumprov tas.

12. TESTETS BEGRÄNSNINGAR

Ett serumprov som tas under infektionens akuta fas, när endast IgM-antikroppar är förekommer, kan vara negativt med det här testet.

Värmeinaktivering av testserum leder inte till felaktiga resultat vid bestämning av anti-CMV IgG (till skillnad från bestämning av anti-CMV IgM).

Nivån för cytomegalovirus IgM bör bestämmas med testkitet Platelia™ CMV IgM. Alternativt kan ett andra serumprov tas 8–14 dagar senare och testas parallellt för att påvisa en ökning i IgG-antikroppsnivån.

När testresultatet tolkas bör hänsyn tas till patientens historik och information som erhålls med andra diagnostiska metoder.

13. ANALYTISK SPECIFICITET

23 prover som var negativa för CMV men innehöll IgG-antikroppar mot virus som rubella, Epstein Barr, herpes simplex, mässling och påssjuka, testades. Förekomst av dessa antikroppar påverkade inte testet i något av fallen.

14. DIAGNOSTISK KÄNSLIGHET OCH SPECIFICITET

Vid en klinisk studie som genomfördes i ett sjukhuslaboratorium analyserades 264 prover, varav 47 var negativa och 217 positiva. Proverna analyserades med en annan kommersiell immunoenzymatisk metod: Metoderna uppvisade 100 % överensstämmelse, både för positiva och negativa prover.

Testkitet Platelia™ CMV IgG ger 100 % känslighet och specificitet.

15. PRECISION

Tabell 2. Precision inom körning, utfört på 3 olika partier

Gränsv ärde n=21	***Partinr 104***	***Partinr 105***	***Partinr 106***
OD	0.453	0.374	0.433
CV %	4.62	4.73	4.07

Tabell 3 Precision mellan körningar

	EU/ml			
Prov	**Körning I**	**Körning II**	**Körning III**	**CV %**
nr 1	12.6	17.5	17.6	18
nr 2	78.5	87.5	96.3	10

16. FELSÖKNING

PROBLEM	**MÖJLIG ORSAK**	**ÅTGÄRD**
Ogiltig körning (alla negativa)	Ett eller flera reagenser har inte tillsatts eller tillsattes i fel ordning	Kontrollera testförfarandet Se efter om det finns oanvända lösningar. Upprepa testet.
	Icke reaktiv platta	Kontrollera koden på plattans förpackning (rätt kod anges under punkt 4 i bipacksedeln).
		Kontrollera om den oanvända plattan har utsatts för fukt. (Torkmedlet kiselgel måste vara ljust gult.) Upprepa testet.
Ogiltig körning (alla positiva)	Kontaminering av substrat	Ta nytt substrat.
	Bristfällig tvättning	Kontrollera att tvättutrustningen fungerar
Dålig precision	Ofullständig tvättning av brunnar	Kontrollera att tvättutrustningen fungerar
	Bristfällig aspirering, brunnar	Kontrollera att tvättutrustningen fungerar
	Pipetteringsfel	Kontrollera pipettfunktionen
	För långsam reagenstillsats	Se till att plattan inte torkar efter tvättning. Tillsätt reagenserna omdelbart
	Förekomst av bubblor	Undvik luftbubblor vid pipettering.
	Smutsig optisk utrustning	Kontrollera om instrumentets ljuskälla och -detektor är smutsiga. Torka av plattans botten med en mjuk trasa.
Bristfällig färgutveckling	Felaktig inkuberingstid eller - temperatur	Kontrollera temperaturkontroll och tidövervakning
		Följ rekommenderade anvisningar.
	Felaktig mängd substrat tillsatt i plattan	Kontrollera pipettfunktionen.

17. REFERENSER

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE	- CE-märkning (Europa direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter lör in vitro-diagnostik)
IVD	- *In vitro* diagnostik
	- Tillverkad av
	- Temperaturbegränsning
	- Se instruktionsanvisning vid användning

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE **0459**
12/2004

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTS 72680

ENZYMIMMUNMETODE TIL KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AF IgG-ANTISTOFFER MOD CYTOMEGALOVIRUS I HUMANT SERUM



Dansk

INDHOLDSFORTEGNELSE

1. FORMÅL

ENZYMIMMUNMETODE TIL KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AF IgG-ANTISTOFFER MOD CYTOMEGALOVIRUS I HUMANT SERUM

2. OPSUMMERING OG FORKLARING AF TESTEN

Cytomegalovirus er en herpesvirus, der overføres ved tæt menneskelig kontakt. I de fleste tilfælde er der ingen synlige infektionssymptomer. Virussen er dog yderst farlig og kan være dødbringende for patienter med nedsat immunforsvar. Serum-negative kvindelige patienter, som inficeres under en graviditet, kan overføre sygdommen til fosteret. I 95% af tilfældene sker dette uden symptomer, men hos nogle nyfødte kan det føre til gulsot, hepatosplenomegali (lever- og miltforstørrelse) og retarderet psykomotorisk udvikling. Det er derfor uhyre vigtigt at vurdere patientens immunforsvar og kontrollere for serumkonversion. En markant stigning i titeren for anti-Cytomegalovirus IgG indikerer en nylig pådraget infektion eller genaktivering af en latent infektion.

3. TESTPRINCIP

Testen er baseret på ELISA-teknikken (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-7).
Antigenet, der består af delvist renset og inaktiveret Cytomegalovirus, bindes til den faste fase (strips med 8 brønde). De specifikke immunglobuliner bindes til antigenet via inkubation med fortyndet humant serum.
Efter afvaskninger for at fjerne de proteiner, der ikke har reageret, udføres inkubationen med konjugatet, der består af humane, monoklonale IgG-antistoffer konjugeret til peberrod-peroxidase.
Det ubundne konjugat fjernes og peroxidasesubstratet tilføres.
Den blå farve, der udvikles, er proportional med koncentrationen af specifikke antistoffer i serumprøven. Når den enzymatiske reaktion afbrydes ved at tilsætte en svovlsyreopløsning, kan den gule farve, der udvikles, let aflæses ved hjælp af en mikropladeaflæser.

4. INDHOLDET AF SÆTTET OG KLARGØRING AF REAGENSER

- Der er reagenser nok til 96 bestemmelser.

Lad materialet nå stuetemperatur før anvendelse.

MT PLATE *MIKROPLADE. 12 x 8 brønde dækket med Cytomegalovirus.*
Anvendelse: Åbn pakken på den modsatte side af koden (C plus partinummer), som er nyttig i forbindelse med identifikation. Tag støtterammen og de strips, der skal bruges, ud af foliepakningen, og placer de ubrugte strips i plastposen med kiselgel. Pres luften ud, og forsegl posen ved at trykke på lukkemekanismen.

CALIBRATORS *5 x 1,6 ml*
Indhold: Fortyndet humant serum, der indeholder kendte koncentrationer af anti-CMV IgG-antistoffer, i 0,01 mol/l fosfatbuffer med 1% BSA og 0,09% natriumazid, flydende, klar til brug uden yderligere fortynding. Værdierne kan udtrykkes i IU/ml eller EU/ml (se konverteringstabellen i kapitel 11). Kalibrator 2 (1 IU/ml eller 10 EU/ml) svarer til cut-off-værdien og kan anvendes i den kvalitative test. Kalibratorerne har følgende værdier: 0,5, 1, 5, 10, 20 IU/ml, der er opnået ved titrering mod WHOs **"Anbefalede Internationale Standard".**
Farve: Kalibratorfarven er proportional med den relative antistof-titer.

CONJ *KONJUGAT. 1 x 16 ml*
Indhold: Monoklonale antistoffer, som er mærket med peroxidase, i fosfatbufferopløsning med 0,05% fenol og 0,02% Bronidox. Klar til brug uden yderligere fortynding.

CONTROL IgG - *IgG-NEGATIV KONTROLPRØVE (PF93910) 1 x 1,6 ml*
KAN BRUGES MED FLERE FORSKELLIGE PARTIER
Indhold: Humant serum uden anti-CMV IgG-antistoffer, fortyndet i 0,01 mol/l fosfatbuffer med 1% BSA og 0,09% natriumazid, flydende, klar til brug uden yderligere fortynding (Kalibrator 0).
Stabilitet: Produktet er stabilt indtil udløbsdatoen ved opbevaring uåbnet ved 2 til 8°C.

WASH BUF 10x *VASKEBUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 ml*

KAN BRUGES MED FLERE FORSKELLIGE PARTIER

Indhold: Fosfatbufret saltvand, koncentreret 10 gange – indeholder 0,5% Brij.

Klargøring: Fortynd den ønskede mængde i forholdet 1:10 med destilleret vand for at få en brugsklar vaskebuffer. Ved forekomst af krystaller bør disse opløses ved 37°C før fortyndingen.

SAMP DIL 50x *FORTYNDER 50X (PF93601). 1 x 4,5 ml. Til fortynding af serumprøver.*

KAN BRUGES MED FLERE FORSKELLIGE PARTIER

Indhold: Proteinopløsning, der er koncentreret 50 gange og tilsat 0,05% fenol og 0,02% Bronidox.

Klargøring: Fortynd den ønskede mængde i forholdet 1:50 i vaskebufferen for at få en brugsklar fortynder.

SUBS TMB *SUBSTRAT (PF93619). 12 ml. Klar til brug.*

KAN BRUGES MED FLERE FORSKELLIGE PARTIER

Indhold: 0,26 mg/ml tetramethylbenzidin og 0,01% hydrogenperoxid stabiliseret i 0,05 mol/l citratbuffer (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *STOPOPLØSNING (PF93602). 1 x 16 ml.*

KAN BRUGES MED FLERE FORSKELLIGE PARTIER

H_2SO_4 0,3 mol/l i brugsklar opløsning.

SELVKLÆBENDE FILM (2)
PLASTPOSE (1)

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER.
- Inkubator ved 37°C
- Mikropladelæser (bølgelængde 450 eller 450/620 nm og 405 nm med linearitet op til OD >= 2000)
- Mikropladevasker (anbefales), som kan fordele mængder på mellem 225-375 µl
- Destilleret eller deioniseret vand
- Normalt laboratorieglasudstyr: Cylindere, testrør osv.
- Mikropipetter til udtagning af 10, 100, 1000 µl opløsning
- Engangshandsker
- Timer
- Natriumhypochloritopløsning (5%).
- Beholdere til præcis af potentielt smittefarligt materiale
- Sugende papir

5. OPBEVARING OG STABILITET AF REAGENSER

Reagenser skal opbevares ved 2 til 8°C.
Udløbsdatoen er trykt på hver komponent og på æskens etiket.

Reagenserne har en begrænset stabilitet efter åbning og/eller klargøring

REAGENS	BETINGELSER
Mikroplade	6 uger ved 2 til 8°C, plastpose
Kalibratorer	6 uger ved 2 til 8°C
Konjugat	6 uger ved 2 til 8°C
Substrat	op til udløbsdatoen ved 2 til 8°C, 1 uge ved 15-30°C, på et mørkt sted
Prøvefortynder	brugsklar, 2 uger ved 2 til 8°C
Rensebuffer	2 uger ved 2 til 8°C, 5 dage ved 15-30°C
Stopopløsning	op til udløbsdatoen ved 2 til 8°C

6. FORHOLDSREGLER

KUN TIL *IN VITRO*-DIAGNOSTICERING.

Dette sæt indeholder materiale af human oprindelse, som er testet negativt (vha. FDA-godkendte metoder) for forekomsten af HbsAg og for anti-HIV-1, anti-HIV-2 og anti-HCV-antistoffer. Da ingen diagnosticeringstest kan give fuld garanti for fravær af smitsomme stoffer, skal materiale af human oprindelse altid håndteres som potentielt smittefarligt. Alle forholdsregler, som normalt er en del af god laboratoriepraksis, bør følges ved håndtering af materiale af human oprindelse.

Sundheds- og sikkerhedsmæssige oplysninger

1. Undgå at pipettere med munden. Anvend engangshandsker og øjenbeskyttelse ved håndtering af prøver og ved udførelse af analyser. Vask hænderne grundigt bagefter.
2. Følgende reagenser indeholder en lav koncentration af skadelige eller lokal-irriterende stoffer:
   a) Rensebufferen indeholder vaskemidler
   b) Konjugatet indeholder fenol
   c) Substratet er en syre
   d) Kontrolprøverne indeholder 0,09% natriumazid, som kan reagere med bly- eller kobberrør og danne højeksplosive metalazider. Fortynd med store mængder vand for at undgå dette.

   Hvis reagenserne kommer i kontakt med huden eller øjnene, skal området vaskes grundigt med vand.
3. Varigt udstyr skal steriliseres efter brug. Den foretrukne metode er autoklavering i en time ved 121°C. Engangsudstyr bør autoklaveres eller destrueres.
4. Svovlsyre, der kræves til stopopløsningen og saltsyre til afvaskning af glas, er ætsende og bør derfor håndteres med den nødvendige forsigtighed. Vask grundigt med vand, hvis disse væsker kommer i kontakt med huden eller øjnene.
5. Neutraliseret syre og andet flydende affald skal dekontamineres ved at tilføje en tilstrækkelig mængde natriumhypochlorit for at opnå en slutkoncentration på mindst 1,0%. Det kan være nødvendigt at udsætte materialet i 30 minutter for 1% natriumhypochlorit for at sikre en effektiv dekontaminering.
6. Hvis der spildes potentielt inficeret materiale, skal dette straks fjernes med sugende papir, og det kontaminerede område bør tørres efter med f.eks. 1,0% natriumhypochlorit, før arbejdet fortsættes. Natriumhypochlorit bør ikke anvendes på syreholdige væsker, der spildes, medmindre det område, der er spildt på, først tørres grundigt. De materialer, der bruges til rengøring af spildte væsker, heriblandt også handsker, skal bortskaffes som potentielt biologisk farligt materiale. Materialer, der indeholder natriumhypochlorit, må ikke autoklaveres.

Forholdsregler ved analyse

1. Lad alle reagenser og prøver stabilisere sig ved stuetemperatur (18 til 30°C), før de anvendes. Sæt reagenserne til opbevaring ved den anbefalede opbevaringstemperatur straks efter brug. **Det er vigtigt at arbejde ved de korrekte temperaturer. Kontroller, at termostaten ikke viser under 35°C eller over 39°C.** Åbn først konvolutten med stripsene efter mindst 30 minutter ved stuetemperatur.
2. Brug ikke reagenserne efter den angivne udløbsdato. Mikrobiologisk kontaminering af reagenser bør undgås, da dette kan reducere produktets levetid og fremkalde fejlagtige resultater.
3. Undgå at ændre testproceduren eller bruge reagenser fra andre producenter eller andre partier, medmindre reagenset er anført som anvendeligt med forskellige partier. Afkort ikke de anbefalede inkubationstider.
4. Glas, der bruges med reagenserne, bør vaskes grundigt med 2M saltsyre og derefter skylles med destilleret eller deioniseret vand af høj kvalitet.
5. Udsæt ikke reagenserne for kraftigt lys eller hypochlorit-dampe under opbevaring eller inkubation.
6. Brøndene må ikke udtørre under analyseproceduren.
7. Vær omhyggelig med at undgå krydskontaminering af reagenser. Brug en ny pipette for hver reagens.
8. Udvis forsigtighed, så konjugatet ikke rører ved eller sprøjter ud på brøndens kant. Undgå "blow-out" fra mikropladerne.
9. Enzymimmunanalyser kan fra tid til anden udvise en "edge effect" (kanteffekt), som skal minimeres ved at øge fugtigheden i løbet af inkubationstrinnene. Pladerne skal være dækket med låg og skal inkuberes ved 37°C enten i et vandbad med stativ eller en flydende holder for at støtte pladerne, hvis det er nødvendigt, eller i en inkubator. Pladerne kan også inkuberes i et godkendt analyseinstrument. Se den pågældende betjeningsvejledning for at få yderligere oplysninger. Der må ikke anvendes CO_2-inkubatorer.
10. Kontroller, at bunden af pladen er ren og tør, og at der ikke er bobler på overfladen af væsken, før aflæsning af pladen.
11. Brug af stærkt hæmolyserede prøver, ikke fuldstændigt koagulerede sera eller prøver med mikrobiel kontamination kan give fejlagtige resultater.
12. Det er vigtigt at læse producentens brugervejledning grundigt, hver gang et instrument tages i brug, for at få yderligere oplysninger om følgende punkter:
    - installation og særlige krav
    - betjeningsprincipper, instruktioner, forholdsregler og risici
    - producentens specifikationer og instrumentets ydeevne
    - service og vedligeholdelse.

7. TYPER OG OPBEVARING AF PRØVER

Prøven består af serum, der er indsamlet på normal vis fra en vene og håndteret i henhold til reglerne for god laboratoriepraksis. Den friske serum kan opbevares 4 dage ved 2 til 8°C eller nedfryses i længere perioder ved -20°C og må maksimalt optøs 3 gange. Optøede prøver skal rystes grundigt før anvendelse. Prøvens kvalitet kan påvirkes markant af mikrobiel kontamination, hvilket kan give fejlagtige resultater.
Stærkt lipæmiske, ikteriske eller kontaminerede prøver bør ikke anvendes. Hvis det ikke er muligt at skaffe en ny prøve, bør sådanne prøver renses ved filtrering (0,45 µm) eller centrifugering.
Humant plasma kan ikke anvendes i testen.

8. TESTPROCEDURE

Manuel teknik

- Klargør det påkrævede antal strips.
- Klargør vaskebufferen ved at fortynde rensebufferen 10x (100 ml + 900 ml H_2O).
- Klargør den påkrævede fortynder til prøver ved at tilsætte 1 del fortynder 50x til 49 dele af den fortyndede vaskebuffer (f.eks.: 2 ml + 98 ml fortyndet vaskebuffer).

Fortynd prøverne i forholdet 1:101 ved at fordele 10 µl serum i 1 ml fortynder. Tilsæt 100 µl af hver fortyndet prøve pr. brønd (dobbelttest anbefales). Placer UFORTYNDEDE kalibratorer (dobbelt hvis muligt) på en strip (100 µl i hver brønd). Gem en brønd til en blindprøve, der udføres ved hjælp af 100 µL af substratblandingen.
Brøndene dækkes med beskyttende film og inkuberes i 45 minutter ved 37°C. Efter skylning fire gange i 30 sekunder (300 µl), skal der tilføjes 100 µl konjugat til hver brønd, hvorefter brøndende igen tildækkes med den beskyttende film og inkuberes i 45 minutter ved 37°C. Pladen skylles igen fire gange som beskrevet ovenfor. Til sidst fordeles substratet med 100 µl/brønd.
Efter 15 minutter ved stuetemperatur stoppes enzymreaktionen med 100 µl stopopløsning.
Absorbansen (O.D.) aflæses ved 450 nm eller 450/620 nm inden for 30 min. Foretag en aflæsning igen ved 405 nm, hvis OD-værdien er højere end 2000.

9. SKEMA OVER TESTPROCEDUREN for Platelia™ CMV IgG

Manuel teknik

TRIN 1 Placer 100 µl fortyndet prøvemateriale/kontrolprøver i stripsenes brønde.

Inkuber i 45 minutter ved 37°C

Skyl 4 gange (300 µl)

TRIN 2 Tilsæt 100 µl konjugat til hver brønd

Inkuber i 45 minutter ved 37°C

Skyl 4 gange (300 µl)

TRIN 3 Tilsæt 100 µl substrat til hver brønd

Inkuber i 15 minutter ved stuetemperatur

TRIN 4 Tilsæt 100 µl stopopløsning

Aflæs absorbansen ved 450 nm inden for 30 min.

10. VALIDERING AF TEST

1. **KONTROL -** (Kalibrator 0): OD-værdien for den negative kontrolprøve skal være < 0,6 gange OD-værdien for Kalibrator 2.
2. OD-værdien for Kalibrator 2 skal være ≥ 0,2 ved 450 nm og >= 0,16 ved 450/620 nm.
3. OD-værdien for Kalibrator 5 skal være over 1,2.

11. FORTOLKNING AF RESULTATER

KVANTITATIVE RESULTATER

Angiv OD-værdien for kalibratorerne i en graf efter at have trukket OD-værdien fra blindprøven. Den tilsvarende titer fra testprøven kan opnås ved ekstrapolation.

BEMÆRK: Der skal udregnes en standardkurve for hver kørsel.

Hvis OD-værdien for en prøve eller kalibrator er over 2,0, skal aflæsningen foretages ved 405 nm og værdien ganges med 3.

Konvertering af OD-værdien til enheder/ml

Anti-Cytomegalovirus IgG kan udtrykkes i EU/ml (arbitrære enheder) eller i IU/ml (foreslået anti-CMV IgG WHO-standard) ved ekstrapolation af resultaterne af de 6 kalibratorer og sammenligning af prøvens OD-værdi med den opnåede kurve.

Tabel 1: Kalibratorværdier i arbitrære og internationale enheder

	EU/ml	(IU /ml)
Kalibrator 0	0	0
Kalibrator 1	5	0,5
Kalibrator 2	10	1
Kalibrator 3	50	5
Kalibrator 4	100	10
Kalibrator 5	200	20

Graden af immunitet kan fortolkes som følger:

IMMUN: Hvis koncentrationen af anti-Cytomegalovirus IgG i prøven er > 12 EU/ml eller 1,2 IU/ml

IKKE-IMMUN: Hvis koncentrationen af anti-Cytomegalovirus er < 8 EU/ml eller < 0,8 IU/ml

TVIVLSOM: Hvis resultatet ligger mellem de to værdier. I dette tilfælde anbefales det at teste igen i en dobbeltkørsel.

KVALITATIVE RESULTATER

Beregn forholdet mellem prøvens OD-værdi og værdien for cut-off-prøven (Kalibrator 2). Prøven betragtes som:

Positiv: Hvis forholdet er > 1,2.
Tvivlsom: Hvis forholdet er > 0,8 - < 1,2
Negativ: Hvis forholdet er < 0,8.

Hvis resultatet er tvivlsomt, bør testen gentages. Hvis det fortsat er tvivlsomt, bør der tages en ny serumprøve.

12. PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

En serumprøve, der er indsamlet under en akut infektion, når der kun er forekomst af IgM-antistoffer, kan være negativ med denne procedure.

Varmeinaktivering at testserum giver ikke fejlagtige resultater ved bestemmelse af anti-CMV IgG, som det er tilfældet med anti-CMV IgM.

Cytomegalovirus IgM-niveauet bør bestemmes ved hjælp af Platelia™ CMV IgM-sættet. Alternativt kan en anden serumprøve, der er indsamlet 8-14 dage senere, testes parallelt for at se, om IgG-antistofniveauet er steget.

Testresultaterne skal anvendes sammen med oplysninger fra evalueringen af sygdomshistorien eller andre diagnostiske procedurer.

13. ANALYTISK SPECIFICITET

Der blev testet 23 prøver, som blev fundet negative for CMV, men som indeholdt IgG-antistoffer mod vira såsom røde hunde, Epstein Barr, Herpes Simplex, mæslinger og fåresyge. Forekomsten af disse antistoffer påvirkede ikke testen.

14. DIAGNOSTISK SENSITIVITET OG SPECIFICITET

I forbindelse med en klinisk undersøgelse på et hospitalslaboratorium blev 264 prøver analyseret. Af disse var 47 negative og 217 var positive. Prøverne blev analyseret med en anden kommerciel enzymimmunmetode: Der var 100% overensstemmelse mellem de to metoder, både for de positive og de negative prøver.

Sættet med Platelia™ CMV-IgG tilbyder 100% sensitivitet og specificitet.

15. PRÆCISION

Tabel 2. Præcision under testkørsel – udført på 3 forskellige partier

Cut-off n=21	*Parti N.104*	*Parti N. 105*	*Parti N. 106*
O.D.	0,453	0,374	0,433
VK%	4,62	4,73	4,07

Tabel 3. Præcision mellem testkørsler

	EU/ml			
Prøve	**kørsel I**	**kørsel II**	**kørsel III**	**VK%**
n.1	12,6	17,5	17,6	18
n.2	78,5	87,5	96,3	10

16. HJÆLP TIL FEJLFINDING

PROBLEM	**MULIG KILDE**	**TEST ELLER HANDLING**
Ugyldig kørsel (alle negative)	En eller flere reagenser blev ikke tilføjet eller blev tilføjet i forkert rækkefølge	Kontroller proceduren igen Kontroller, om der er ubenyttede opløsninger. Gentag testen.
	Ikke-reaktiv plade	Kontroller koden på pakken med pladen (se den korrekte kode i afsnit 4 på pakkens indlægsseddel).
		Kontroller, om der er fugtigt på den ubrugte plade (kiselgelen skal være lysegul). Gentag testen.
Ugyldig kørsel (alle positive)	Kontamination af substrat	Tag ny mængde substrat.
	Utilstrækkelig vask	Kontroller, at vaskeudstyret fungerer korrekt.
Dårlig præcision	Ufuldstændig vask af brønde	Kontroller, at vaskeudstyret fungerer korrekt.
	Utilstrækkelig opsugning af brønde	Kontroller, at vaskeudstyret fungerer korrekt.
	Pipetteringsfejl	Kontroller pipettefunktionen
	For langsom tilføjelse af reagenser	Undgå at tørre pladen efter vasketrinnet. Tilsæt straks reagenser.
	Forekomst af bobler	Undgå luftbobler under pipettering.
	Optisk bane ikke ren	Kontroller, om der er snavs på udstyrets lyskilde og detektor. Tør bunden af pladen med en blød klud.
Utilstrækkelig farveudvikling	Forkerte inkubationstider eller -temperaturer	Kontroller temperaturindstilling og tidsmonitorering
		Se den anbefalede brugsvejledning.
	Utilstrækkelig mængde substrat tilsat pladen	Kontroller pipettefunktionen.

17. <u>REFERENCER</u>

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. M. Musiani et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE	- CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik)
IVD	- *In vitro* diagnose
	- Fremstillet af
	- Temperaturbegrænsning
	- Se instruktion før brug

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE **0459**
12/2004

BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 ΔΟΚΙΜΕΣ 72680

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΛΑΣΗΣ IgG ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΟΥ



Greek

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΛΑΣΗΣ IgG ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΟΥ

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΔΙΕΥΚΡΙΝΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Ο κυτομεγαλοϊός (ή κυτταρομεγαλοϊός) είναι ένας ιός έρπητα ο οποίος μεταδίδεται μέσω στενής επαφής των ατόμων. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα συμπτώματα δεν είναι εμφανή . Ωστόσο, ο ιός είναι πολύ επικίνδυνος και μπορεί να αποβεί μοιραίος για ασθενείς υπό ανοσοκαταστολή. Γυναίκες ασθενείς με αρνητικό ορό που όμως μολύνθηκαν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να μεταδώσουν τη νόσο στο έμβρυο. Στο 95% των περιπτώσεων αυτό συμβαίνει χωρίς συμπτώματα, αλλά κάποια νεογνά μπορεί να παρουσιάσουν ίκτερο, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία καθώς και καθυστερημένη ψυχική και κινητική ανάπτυξη. Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό να προσδιορίζεται η κατάσταση ανοσίας του ασθενή και να ελέγχεται η ορομετατροπή. Μία σημαντική αύξηση του τίτλου anti-Cytomegalovirus IgG είναι ενδεικτική πρόσφατης μόλυνσης ή επανενεργοποίησης μιας λανθάνουσας μόλυνσης.

3. ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η δοκιμή βασίζεται στην αρχή της τεχνικής ELISA (Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός) (1-7).
Το αντιγόνο, που αποτελείται από μερικώς καθαρό και ανενεργό κυτταρομεγαλοϊό, δεσμεύεται κατά τη στερεά φάση (**σειρές των κοιλοτήτων** 8 κοιλοτήτων). Οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες δεσμεύονται με το αντιγόνο μέσω επώασης σε αραιωμένο ανθρώπινο ορό.
Έπειτα από πλύσεις για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν αντέδρασαν, διεξάγεται επώαση με το συζυγές που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα IgG συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση.
Το μη δεσμευμένο συζυγές αφαιρείται και προστίθεται υπόστρωμα υπεροξειδάσης.
Το μπλε χρώμα που αναπτύσσεται είναι ευθέως ανάλογο της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων που υπάρχουν στο δείγμα ορού. Όταν η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος θειϊκού οξέος, η ανάγνωση του κίτρινου χρώματος που αναπτύχθηκε κατά την αντίδραση είναι εύκολη με τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών

4. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια επαρκούν για 96 προσδιορισμούς.

Πριν από τη χρήση βεβαιωθείτε ότι είναι σταθεροποιημένα σε θερμοκρασία δωματίου.

MT PLATE *ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ. 12 x 8 κοιλοτήτων με επίστρωση Κυτταρομεγαλοϊού.*
Χρήση: ανοίξτε τη συσκευασία από την αντίθετη πλευρά του κωδικού (C και αριθμός παρτίδας) ο οποίος χρησιμεύει για την αναγνώριση του προϊόντος, αφαιρέστε από τη συσκευασία την βάση και τις **σειρές των κοιλοτήτων** που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν και τοποθετήστε τις **σειρές των κοιλοτήτων** που δεν χρησιμοποιούνται στην σακούλα πολυθενίου με το πυριτικό οξύ, βγάλτε τον αέρα και σφραγίστε πιέζοντας .

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ *5 x 1,6 mL*
Περιεχόμενα: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός, με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων anti-CMV IgG, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0,01 mol/L με 1% BSA και 0,09% αζίδιο νατρίου, σε υγρή μορφή, έτοιμος προς χρήση χωρίς περαιτέρω αραίωση. Οι τιμές μπορούν να εκφράζονται σε IU/ml ή σε EU/ml (για τον πίνακα μετατροπής βλέπε ενότητα 11). Ο βαθμονομητής 2 (1 IU/ml ή 10 EU/mL) αντιστοιχεί στην τιμή κατωφλίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποιοτική δοκιμή. Οι βαθμονομητές έχουν τις ακόλουθες τιμές: 0,5, 1, 5, 10, 20 IU/mL, που προκύπτουν από τιτλοποίηση βάσει του **"Προτεινόμενου Διεθνούς Προτύπου ΠΟΥ".**
Χρώμα: το χρώμα των βαθμονομητών είναι ανάλογο του σχετικού τίτλου του αντισώματος.

CONJ *ΣΥΖΥΓΕΣ. 1 x 16 mL.*
Περιεχόμενα: μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με υπεροξειδάση, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με 0,05% φαινόλη και 0,02% Bronidox. Έτοιμα προς χρήση χωρίς περαιτέρω αραίωση.

CONTROL IgG - *ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ IgG (PF93910) 1 x 1,6 mL*

ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ

Περιεχόμενα: Ανθρώπινος ορός χωρίς αντισώματα anti-CMV IgG, αραιωμένος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0,01 mol/L με 1% BSA και 0,09% αζίδιο νατρίου, σε υγρή μορφή, έτοιμος προς χρήση χωρίς περαιτέρω αραίωση (Βαθμονομητής 0).

Σταθερότητα: Το προϊόν παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης εφόσον αποθηκεύεται κλειστό στους 2 έως 8°C.

WASH BUF 10x *ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603). 1 x 100 mL*

ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ

Περιεχόμενα: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, συμπυκνωμένο 10 φορές και περιέχει 0,5% Brij.

Προετοιμασία: αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο 1:10 με απεσταγμένο νερό προκειμένου να προκύψει το έτοιμο προς χρήση ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Εάν υπάρχουν κρύσταλλοι, πρέπει να διαλυθούν στους 37°C πριν από την αραίωση.

SAMP DIL 50x *ΑΡΑΙΩΤΙΚΟ 50X (PF93601). 1 x 4.5 mL. Για την αραίωση δειγμάτων ορού.*

ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ

Περιεχόμενα: Πρωτεϊνικό διάλυμα συμπυκνωμένο 50 φορές, με προσθήκη 0,05% φαινόλης και 0,02% Bronidox.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο 1:50 με το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης προκειμένου να προκύψει το αραιωμένο έτοιμο προς χρήση διάλυμα.

SUBS TMB *ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619). 12 mL. Έτοιμο προς χρήση.*

ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ

Περιεχόμενα: 0,26 mg/mL τετραμεθυλβενζινδίνης και 0,01% υπεροξειδάσης υδρογόνου σταθεροποιημένης σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0,3 M *ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ (PF93602). 1 x 16 mL.*

ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ

H_2SO_4 0,3 mol/L, σε έτοιμο προς χρήση διάλυμα.

ΚΟΛΛΗΤΙΚΕΣ ΤΑΙΝΙΕΣ (2)
ΣΑΚΟΥΛΑ ΠΟΛΥΘΕΝΙΟΥ (1)

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.

- Επωαστήρας στους 37°C
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακετών (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα οπτικής πυκνότητας έως και OD >= 2000)
- Συσκευή πλύσης μικροπλακών (κατά προτίμηση) με δυνατότητα κατανομής όγκων που κυμαίνονται μεταξύ 225-375 μl
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Συνήθη εργαστηριακά υαλικά: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες κ.λ.π.
- Μικροπιππέτες για την ακριβή συλλογή διαλύματος 10, 100, 1000 μl
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονομετρητής
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (5%)
- Περιέκτες για την συλλογή δυνητικώς μολυσματικών υλικών
- Απορροφητικό χαρτί.

5. <u>ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ</u>

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2 έως 8°C.
Η ημερομηνία λήξης αναγράφεται επάνω σε κάθε συστατικό και στην ετικέτα του κουτιού.

Τα αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη σταθερότητα μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	**ΣΥΝΘΗΚΕΣ**
Μικροπλάκα	6 εβδομάδες στους 2 έως 8°C, σακούλα πολυθενίου
Βαθμονομητές	6 εβδομάδες στους 2 έως 8°C
Συζυγές	6 εβδομάδες στους 2 έως 8°C
Υπόστρωμα	μέχρι την ημερομηνία λήξης στους 2 έως 8°C, 1 βδομάδα στους 15 έως 30°C; σε σκοτεινό χώρο
Αραιωτικό Δείγματος	έτοιμο προς χρήση, 2 εβδομάδες στους 2 έως 8°C
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	2 εβδομάδες στους 2 έως 8°C, 5 ημέρες στους 15 έως 30°C
Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης	μέχρι την ημερομηνία λήξης, στους 2 έως 8°C

6. <u>ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ</u>

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO.*

Αυτό το κιτ περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν υποβληθεί σε δοκιμή με μεθόδους εγκεκριμένες από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και βρέθηκε αρνητικό για την παρουσία HbsAg και αντισωμάτων anti-HIV-1, anti-HIV-2 και anti-HCV. Καθώς καμία διαγνωστική δοκιμή δεν μπορεί να εγγυηθεί με απόλυτη βεβαιότητα την απουσία μολυσματικών παραγόντων, όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά. Κατά τον χειρισμό υλικού ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να τηρούνται όλες οι συνήθεις εργαστηριακές πρακτικές.

<u>Οδηγίες για την υγεία και την ασφάλεια</u>

1. Μην αναρροφάτε με το στόμα. Κατά τον χειρισμό των δειγμάτων και τη διεξαγωγή της δοκιμής, φοράτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά ματιών. Πλένετε τα χέρια σας καλά αφού τελειώσετε.
2. Τα παρακάτω αντιδραστήρια περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις βλαβερών ή ερεθιστικών ουσιών:
   α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει απορρυπαντικά
   β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
   γ) το υπόστρωμα είναι οξύ
   δ) οι μάρτυρες περιέχουν 0,09% αζίδιο νατρίου το οποίο μπορεί να αντιδράσει με τον μόλυβδο και τον χαλκό των σωληνώσεων σχηματίζοντας άκρως εκρηκτικά ιζήματα μεταλλικών αζιδίων. Αραιώστε με άφθονο νερό για να το απομακρύνετε.

   Εάν οιοδήποτε αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή τα μάτια, πλύνετε με άφθονο νερό.
3. Τα εξαρτήματα που δεν επαναχρησιμοποιούνται πρέπει να αποστειρώνονται μετά από τη χρήση. Η προτιμότερη μέθοδος είναι με κλίβανο αποστείρωσης επί 1 h στους 121°C. Τα εξαρτήματα μιας χρήσης πρέπει να αποστειρώνονται σε κλίβανο πριν από την απόρριψή τους ή να αποτεφρώνονται.
4. Το θειϊκό οξύ που απαιτείται για το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται στην πλύση των υαλικών είναι διαβρωτικά και πρέπει να υπόκεινται σε χειρισμό με την αρμόζουσα προσοχή. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα ή τα μάτια, πλύνετε με άφθονο νερό.
5. Τα εξουδετερωμένα οξέα και άλλα απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται με προσθήκη επαρκούς όγκου υποχλωριώδους νατρίου έως ότου να επιτυγχάνεται τελική συγκέντρωση τουλάχιστον 1,0%. Για τη διασφάλιση αποτελεσματικής απολύμανσης ενδέχεται να χρειάζεται έκθεση σε 1% υποχλωριώδους νατρίου επί 30 λεπτά.
6. Πιτσίλισμα δυνητικώς μολυσματικών υλικών πρέπει να απομακρύνεται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και να καθαρίζεται η μολυσμένη περιοχή με, για παράδειγμα, 1,0% υποχλωριώδες νάτριο πριν από τη συνέχεια της εργασίας. Το υποχλωριώδες νάτριο δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό στιγμάτων που περιέχουν οξύ, εκτός και αν η περιοχή που πιτσιλίστηκε έχει σκουπιστεί και έχει στεγνώσει. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των λεκέδων, περιλαμβανομένων των γαντιών, πρέπει να απορρίπτονται ως προϊόντα που συνιστούν βιολογικό κίνδυνο. Μην αποστειρώνετε σε κλίβανο τα υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Αναλυτικές προφυλάξεις

1. Πριν από την χρήση αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (18 έως 30°C). Αμέσως μετά από τη χρήση τοποθετήστε τα αντιδραστήρια σε χώρο με την συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης. **Είναι σημαντικό να εργάζεστε στη σωστή θερμοκρασία. Ελέγξτε ο θερμοστάτης να μην πέφτει κάτω από τους 35°C ή να μην υπερβαίνει τους 39°C.** Ανοίξτε τη συσκευασία με τις ταινίες μετά από παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου διάρκειας τουλάχιστον ½ ώρας.
2. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης. Πρέπει να αποφεύγεται η μικροβιολογική μόλυνση των αντιδραστηρίων διότι μπορεί να ελαττώσει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος και να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
3. Μην τροποποιείτε τη διαδικασία της δοκιμής ούτε να υποκαθιστάτε αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών ή άλλων παρτίδων, εκτός εάν το αντιδραστήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με άλλες παρτίδες. Μην μειώνετε τους συνιστώμενους χρόνους επώασης.
4. Κάθε υαλικό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί με τα αντιδραστήρια πρέπει να πλένεται πολύ καλά με υδροχλωρικό οξύ 2M και, στη συνέχεια, να ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό ή με υψηλής ποιότητας απιονισμένο νερό.
5. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε δυνατό φως ή σε υποχλωριώδεις αναθυμιάσεις κατά την αποθήκευση ή κατά τα στάδια της επώασης.
6. Μην αφήνετε να στεγνώσουν οι κοιλότητες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προσδιορισμού.
7. Λαμβάνετε μέριμνα για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων. Είναι σημαντικό να χειρίζεστε τα διάφορα αντιδραστήρια με πιπέτες αποκλειστικής χρήσης.
8. Λαμβάνετε μέριμνα για την αποφυγή επαφής ή πιτσιλίσματος του συζυγούς με την άκρη της κοιλότητας. Μην φυσάτε στις μικροπλακέτες.
9. Οι ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί μπορούν να παρουσιάσουν το "φαινόμενο ακμής" που πρέπει να ελαχιστοποιείται αυξάνοντας την υγρασία κατά τη διάρκεια των φάσεων της επώασης. Οι πλακέτες πρέπει να καλύπτονται με τα καλύμματά τους και να επωάζονται στους 37°C, είτε σε λουτρό με βάση στήριξης ή με πλωτήρα για τη στήριξη των πλακετών εάν χρειάζεται, ή σε επωαστήρα. Εναλλακτικά, οι πλακέτες μπορούν να επωάζονται σε εγκεκριμένη συσκευή ανάλυσης. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε το σχετικό Εγχειρίδιο Χρήσης. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται επωαστήρες CO_2.
10. Πριν από την ανάγνωση της πλακέτας, βεβαιωθείτε ότι το κάτω μέρος της πλακέτας είναι καθαρό και στεγνό και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες στην επιφάνεια του υγρού .
11. Η χρήση δειγμάτων που έχουν υποστεί έντονη αιμόλυση, ή δειγμάτων με μη επαρκώς πηγμένους ορούς ή δειγμάτων με μικροβιολογική μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
12. Για κάθε όργανο που χρησιμοποιείτε, διαβάστε προσεκτικά το εγχειρίδιο οδηγιών του κατασκευαστή για επιπρόσθετες λεπτομέρειες σχετικά με τα παρακάτω ζητήματα:
    - εγκατάσταση και ειδικές απαιτήσεις
    - βασικές αρχές λειτουργίας, οδηγίες, προφυλάξεις και κίνδυνοι
    - προδιαγραφές του κατασκευαστή και επιδόσεις του οργάνου
    - επισκευή και συντήρηση.

7. ΤΥΠΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που έχει συλλεχθεί με τον συνήθη τρόπο από τη φλέβα. Κατά τον χειρισμό του ελήφθησαν όλες τις προφυλάξεις που υπαγορεύονται από την ορθή εργαστηριακή πρακτική. Ο φρέσκος ορός μπορεί να αποθηκεύεται για 4 μέρες στους 2 έως 8°C, ή να καταψύχεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους –20°C, και μπορεί να αποψύχεται το μέγιστο 3 φορές. Δείγματα που έχουν αποψυχθεί πρέπει να ανακινούνται με προσοχή πριν από τη χρήση. Η ποιότητα του δείγματος μπορεί να υποβαθμιστεί σημαντικά από μικροβιολογική μόλυνση, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
Πρέπει να αποφεύγονται άκρως λιπαιμικά, ικτερικά ή μολυσμένα δείγματα. Εάν δεν μπορεί να γίνει λήψη νέου δείγματος, τέτοια δείγματα πρέπει να καθαρίζονται με διήθηση (0,45 µm) ή φυγοκέντρηση.
Η δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε ανθρώπινο πλάσμα.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

Χειροκίνητη τεχνική

- Προετοιμάστε τον απαιτούμενο αριθμό σειρών **με κοιλότητες** .
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης αραιώνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Προετοιμάστε το απαιτούμενο αραιωτικό δειγμάτων προσθέτοντας 1 μέρος αραιωτικού 50x σε 49 μέρη του αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (παράδειγμα: 2 mL + 98 mL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης).

Αραιώστε τα δείγματα 1:101 κατανέμοντας 10 µL ορού σε 1 mL αραιωτικού. Κατανείμετε 100 µL κάθε αραιωμένου δείγματος ανά κοιλότητα (συνιστάται διπλή δοκιμή). Τοποθετείστε ΜΗ ΑΡΑΙΩΜΕΝΟΥΣ βαθμονομητές (όπου είναι δυνατό εις διπλούν) σε μία σειρά **κοιλοτήτων** (100 µL σε κάθε κοιλότητα). Αφήστε μία κοιλότητα κενή και συνεχίστε τοποθετώντας 100 µL του μίγματος υποστρώματος.
Οι κοιλότητες καλύπτονται με προστατευτική ταινία και επωάζονται επί 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από τέσσερις πλύσεις επί 30 δευτερόλεπτα (300 µl), προσθέστε 100 µL συζυγούς σε κάθε κοιλότητα και επωάστε πάλι επί 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντας τις κοιλότητες με την προστατευτική ταινία. Η πλακέτα υποβάλλεται πάλι σε πλύση 4 φορές, όπως περιγράφεται παραπάνω. Τέλος, κατανείμετε το υπόστρωμα, 100 µL ανά κοιλότητα.
Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με 100 µL διαλύματος διακοπής της αντίδρασης.
Η ανάγνωση της απορροφητικότητας (O.D.) γίνεται στα 450 nm ή 450/620 nm εντός 30 min. Εάν υπάρχουν αποτελέσματα μεγαλύτερα από 2,000 επαναλάβατε την ανάγνωση στα 405 nm.

9. Σχέδιο διεξαγωγής της δοκιμής για ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟ IgG

Χειροκίνητη τεχνική

ΣΤΑΔΙΟ 1 Τοποθετήστε 100 µL αραιωμένου δείγματος/μαρτύρων στις κοιλότητες των ταινιών.

Επωάστε επί 45 min στους 37°C

Προβείτε σε πλύση 4 φορές (300 µl)

ΣΤΑΔΙΟ 2 Προσθέστε 100 µL συζυγούς σε κάθε κοιλότητα.

Επωάστε επί 45 min στους 37°C

Προβείτε σε πλύση 4 φορές (300 µl)

ΣΤΑΔΙΟ 3 Προσθέστε 100 µL υποστρώματος σε κάθε κοιλότητα.

Επωάστε επί 15 min σε θερμοκρασία δωματίου

ΣΤΑΔΙΟ 4 Προσθέστε 100 µL διαλύματος διακοπής της αντίδρασης

Αναγνώσατε την απορροφητικότητα στα 450 nm εντός 30 min

10. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

1. **ΜΑΡΤΥΡΑΣ -** (Βαθμονομητής 0): η οπτική πυκνότητα του αρνητικού μάρτυρα πρέπει να είναι < 0,6 φορές από την οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή 2.
2. Η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή 2 πρέπει να είναι ≥ 0,2 στα 450 nm, >= 0,16 στα 450/620 nm.
3. Η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή 5 πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 1,2.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βρείτε την OD των βαθμονομητών στο γράφημα, αφού αφαιρέσετε την OD του μηδενικού μάρτυρα (κοιλότητα χωρίς αντιδραστήριο). Ο αντίστοιχος τίτλος του δείγματος της δοκιμής μπορεί να ληφθεί με παρεκβολή.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για κάθε δοκιμή πρέπει να χαράσσεται η πρότυπη καμπύλη.
Εάν η οπτική πυκνότητα ενός δείγματος ή βαθμονομητή είναι μεγαλύτερη από 2,0, επαναλάβετε την ανάγνωση στα 405 nm και πολλαπλασιάστε την τιμή επί 3.

Μετατροπή της οπτική πυκνότητας σε μονάδες/mL

Το anti-Cytomegalovirus IgG μπορεί να εκφραστεί σε EU/mL (αυθαίρετες μονάδες) ή σε IU/mL (προτεινόμενη από το πρότυπο ΠΟΥ για τα anti CMV IgG), με παρεκβολή των αποτελεσμάτων των 6 βαθμονομητών και συγκρίνοντας την OD του δείγματος με την καμπύλη που προκύπτει.

Πίνακας 1: Τιμές βαθμονομητών σε αυθαίρετες και διεθνείς μονάδες

	EU/mL	IU/mL
Βαθμονομητής 0	0	0
Βαθμονομητής 1	5	0.5
Βαθμονομητής 2	10	1
Βαθμονομητής 3	50	5
Βαθμονομητής 4	100	10
Βαθμονομητής 5	200	20

Ο βαθμός ανοσίας μπορεί να ερμηνευτεί ως εξής:

ΑΝΟΣΙΑ: όταν η συγκέντρωση anti-Cytomegalovirus IgG στο δείγμα είναι > 12 EU/mL ή 1,2 IU/mL

ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΑΝΟΣΙΑ: όταν η συγκέντρωση anti-Cytomegalovirus IgG είναι < 8 EU/mL ή < 0,8 IU/mL

ΑΜΦΙΒΟΛΟ: εάν το αποτέλεσμα βρίσκεται μεταξύ των δύο τιμών. Σε αυτή την περίπτωση συνιστάται η επανάληψη της δοκιμής.

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:
Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της τιμής της οπτικής πυκνότητας του δείγματος και της τιμής κατωφλίου (Βαθμονομητής 2). Το δείγμα θεωρείται:
Θετικό: εάν ο λόγος είναι > 1,2.
Αμφίβολο: > 0.8 - < 1.2
Αρνητικό: εάν ο λόγος είναι < 0,8.

Εάν το αποτέλεσμα είναι αμφίβολο, επαναλάβετε τη δοκιμή. Εάν παραμένει αμφίβολο, συλλέξτε νέο δείγμα ορού.

12. ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το δείγμα ορού που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της λοίμωξης, όταν υπάρχουν μόνο αντισώματα IgM, μπορεί να βγει αρνητικό με αυτή τη διαδικασία.
Η αδρανοποίηση του ορού της δοκιμής με θερμότητα δεν οδηγεί σε εσφαλμένα αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό του anti-CMV IgG, όπως ισχύει για το anti-CMV IgM.
Το επίπεδο κυτομεγαλοϊού IgM πρέπει να προσδιορίζεται με το κιτ Platelia™ CMV IgM. Εναλλακτικά, το δεύτερο δείγμα ορού που λαμβάνεται έπειτα από 8 έως 14 ημέρες πρέπει να υποβάλλεται παράλληλα σε δοκιμή για τον προσδιορισμό της αύξησης του επιπέδου αντισωμάτων IgG.
Το αποτέλεσμα της δοκιμής πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που προκύπτουν από την αξιολόγηση του ιατρικού ιστορικού ή άλλων διαγνωστικών διαδικασιών.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Υποβλήθηκαν σε δοκιμή 23 δείγματα που ήταν αρνητικά για τον CMV, αλλά περιείχαν αντισώματα IgG κατά των ιών όπως Ερυθρά, ιός Epstein Barr, ιός Herpes Simplex, Ιλαρά, Παρωτίτιδα. Η παρουσία αυτών των αντισωμάτων δεν επηρέασε σε καμία περίπτωση την δοκιμή.

14. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε κλινική δοκιμή που διεξήχθη σε νοσοκομειακό εργαστήριο, υποβλήθηκαν σε ανάλυση 264 δείγματα εκ των οποίων 47 βρέθηκαν αρνητικά και 217 θετικά. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με άλλη ανοσοενζυμική μέθοδο του εμπορίου: Μεταξύ των δύο μεθόδων υπήρχε συμφωνία 100%, τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά δείγματα.

Το κιτ Platelia™ CMV IgG προσφέρει ευαισθησία και ειδικότητα σε ποσοστό 100%.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Πίνακας 2. Ακρίβεια της ίδιας δοκιμής με 3 διαφορετικές παρτίδες

Τιμή κατωφλίου n=21	***Δέσμη. Ν.104***	***Δέσμη. Ν. 105***	***Δέσμη. Ν. 106***
Οπτική Πυκνότητα	0.453	0.374	0.433
Συντελεστής μεταβολής (%)	4.62	4.73	4.07

Πίνακας 3 Ακρίβεια "Μεταξύ των δοκιμών"

	EU/ml			
Δείγμα	**Δοκιμή I**	**Δοκιμή II**	**Δοκιμή III**	**Συντελεστής μεταβολής (%)**
αρ.1	12.6	17.5	17.6	18
αρ.2	78.5	87.5	96.3	10

16. ΟΔΗΓΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΔΟΚΙΜΗ Ή ΕΝΕΡΓΕΙΑ
Άκυρη δοκιμή (όλα αρνητικά)	Δεν έγινε η προσθήκη ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων ή η προσθήκη έγινε με λάθος σειρά	Ελέγξτε εκ νέου τη διαδικασία Ελέγξτε για μη χρησιμοποιημένα διαλύματα. Επαναλάβετε τη δοκιμή.
	Μη δραστική πλάκα	Ελέγξτε τον κωδικό της συσκευασίας που περιέχει την πλάκα (βλέπε ένθετο συσκευασίας παράγραφος 4 για τον σωστό κωδικό).
		Ελέγξτε για παρουσία υγρασίας στην μη χρησιμοποιημένη πλακέτα. (η αφυγραντική ουσία silica gel (πυριτικό οξύ), πρέπει να έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα). Επαναλάβετε τη δοκιμή.
Άκυρη δοκιμή (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε νέο κλάσμα υποστρώματος.
	Μη κατάλληλη πλύση	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλύσης λειτουργεί σωστά
Ανεπαρκής ακρίβεια	Μη ολοκληρωμένη πλύση των κοιλοτήτων	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλύσης λειτουργεί σωστά
	Μη κατάλληλη αναρρόφηση των κοιλοτήτων	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλύσης λειτουργεί σωστά
	Σφάλμα πιπεταρίσματος	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας
	Πολύ αργή προσθήκη αντιδραστηρίου	Μην αφήνετε την πλακέτα να στεγνώσει μετά από το στάδιο της πλύσης. Προσθέστε αμέσως αντιδραστήρια
	Ύπαρξη φυσαλίδων	Αποφύγετε τη δημιουργία φυσαλίδων κατά τη διάρκεια του πιπεταρίσματος.
	Δεν είναι καθαρή η οπτική δίοδος	Ελέγξτε για τυχόν ακαθαρσίες στην πηγή φωτός του οργάνου και τον ανιχνευτή. Σκουπίστε το κάτω μέρος της πλακέτας με μαλακό πανί.
Μη κατάλληλη ανάπτυξη χρώματος	Εσφαλμένος χρόνος επώασης ή θερμοκρασία	Ελέγξτε τον ρυθμιστή θερμοκρασίας και το χρονόμετρο
		Ακολουθήστε πιστά τις συνιστώμενες οδηγίες χρήσης.
	Προσθήκη μη κατάλληλου όγκου υποστρώματος στην πλακέτα	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980)

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Biorad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33

CE **0459**
12/2004



PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTŮ 72680

IMUNOENZYMATICKÁ METODA KE KVALITATIVNÍMU A KVANTITATIVNÍMU STANOVENÍ PROTILÁTEK TŘÍDY IgG PROTI CYTOMEGALOVIRU V LIDSKÉM SÉRU

IVD

OBSAH

1. POUŽITÍ
IMUNOENZYMATICKÁ METODA KE KVALITATIVNÍMU A KVANTITATIVNÍMU STANOVENÍ PROTILÁTEK TŘÍDY IgG PROTI CYTOMEGALOVIRU V LIDSKÉM SÉRU

2. KLINICKÝ VÝZNAM
Cytomegalovirus je herpes virus přenášený blízkým kontaktem mezi lidmi. Ve většině případů nejsou zjevné žádné symptomy infekce. Virus je však velmi nebezpečný a může být fatální u imunodeprimovaných pacientů. Séronegativní ženy, které se infikují během těhotenství, mohou přenášet onemocnění na plod. V 95 % případech toto proběhne bez symptomů, u některých novorozenců se však může objevit žloutenka, hepatosplenomegalie a retardace psychomotorického vývoje. Z uvedeného důvodu je velmi důležité stanovit imunitní stav pacientky a kontrolovat sérokonverzi. Signifikantní zvýšení titru IgG protilátek proti cytomegaloviru signalizuje probíhající infekci nebo reaktivaci latentní infekce.

3. PRINCIP TESTU
Test je založen na technice ELISA (enzymová imunosorbční analýza) (1-7).
Antigen, složený z částečně purifikovaného a inaktivovaného cytomegaloviru, je navázán na pevnou fázi (stripy po 8 jamkách). Specifické imunoglobulíny se váží k antigenu během inkubace s naředěným lidským sérem.
Po promytí, kterým se odstraní nereagující proteiny, se provádí inkubace s konjugátem, který je tvořen monoklonální protilátkou proti lidskému IgG, značenou křenovou peroxidázou.
Nenavázaný konjugát se odstraní a přidá se substrát pro peroxidázu.
Modré zbarvení, které se vyvine, je úměrné koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku séra.
Po přerušení enzymatické reakce přidáním roztoku kyseliny sírové je možno snadno vyhodnotit žluté zbarvení, které vznikne, pomocí spektrofotometru pro mikrotitrační destičky.

4. OBSAH SOUPRAVY A PŘÍPRAVA REAGENCIÍ
- Reagencie postačují pro 96 stanovení

Před použitím nechte ustálit na pokojovou teplotu.

MT PLATE *MIKROTITRAČNÍ DESTIČKA. 12 x 8 jamek potažených cytomegalovirem.*
Použití: otevřete obal na straně protilehlé ke kódovému označení (písmeno C a číslo šarže), které slouží k identifikaci, vyjměte rámeček a stripy z foliového obalu, vložte nepoužité stripy do polyethylenového sáčku se silikagelem, vytlačte ze sáčku vzduch a neprodyšně jej uzavřete přitlačením uzávěru.

CAL *KALIBRÁTORY 5 x 1,6 ml*
Obsah: Naředěné lidské sérum obsahující známé koncentrace anti-CMV IgG protilátek v 0,01 mol/l fosfátovém pufru s 1 % BSA a 0,09 % azidu sodného, tekuté, hotové k použití bez dalšího ředění. Hodnoty lze vyjádřit buď v jednotkách IU/ml nebo EU/ml (viz převodní tabulka v kapitole 11). Kalibrátor 2 (1 IU/ml nebo 10 EU/ml) odpovídá hodnotě cut-off a může být použit v kvalitativním testu. Kalibrátory jsou o následujících hodnotách: 0,5; 1; 5; 10; 20 IU/ml, připravené titrací podle „**Proposed International Standar WHO“.**
Barva: barva kalibrátorů je úměrná relativnímu titru protilátek.

CONJ *KONJUGÁT 1 x 16 ml*
Obsah: monoklonální protilátky značené peroxidázou, ve fosfátovém pufru obsahujícím 0,05 % fenolu a 0,02 % Bronidoxu. Hotový k použití bez dalšího ředění.

CONTROL IgG- *IgG NEGATIVNÍ KONTROLA (PF93910) 1 x 1,6 ml*
ZAMĚNITELNÉ MEZI ŠARŽEMI
Obsah: Lidské sérum neobsahující anti-CMV IgG protilátky, naředěné v 0,01 mol/l ve fosfátovém pufru s 1 % BSA a 0,09 % azidu sodného, tekuté, hotové k použití bez dalšího ředění (kalibrátor 0).
Stabilita: neotevřený výrobek uložený při teplotě 2-8 °C je stabilní až do data exspirace.

WASH BUF 10x *PROMÝVACÍ ROZTOK 10X (PF93603). 1 x 100 ml* ***ZAMĚNITELNÉ MEZI ŠARŽEMI***
Obsah: 10x koncentrovaný fyziologický roztok, pufrovaný fosfáty; obsahuje 0,5 % Brij.
Příprava: Promývací roztok o pracovní koncentraci připravte naředěním příslušného objemu v poměru 1:10. Jestliže jsou přítomny krystaly, rozpusťte je při 37 °C.

SAMP DIL 50x *ŘEDÍCÍ ROZTOK 50X (PF93601). 1 x 4,5 ml. Pro ředění vzorků séra.* ***ZAMĚNITELNÉ MEZI ŠARŽEMI***
Obsah: 50x koncentrovaný roztok, obsahující 0,05 % fenolu a 0,02 % Bronidoxu.
Příprava: Ředící roztok o pracovní koncentraci připravte naředěním příslušného objemu v poměru 1:50 v promývacím roztoku.

SUBS TMB *SUBSTRÁT (PF93619). 12 ml. Hotový k použití.* ***ZAMĚNITELNÉ MEZI ŠARŽEMI***
Obsah: Tetramethylbenzidin 0,26 mg/ml a peroxid vodíku 0,01 % stabilizovaný v citrátovém pufru 0,05 mol/l (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *ZASTAVOVACÍ ROZTOK (PF93602). 1 x 16 ml.* **ZAMĚNITELNÉ MEZI ŠARŽEMI**
0,3 mol/l H_2SO_4 v roztoku hotovém k použití.

PŘILNAVÁ FÓLIE (2).
POLYETHYLENOVÝ SÁČEK (1).

MATERIÁL NUTNÝ K PROVEDENÍ TESTU, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY.
- Inkubátor s regulací teploty na 37 °C.
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky (vlnová délka 450 nm nebo 450/620 nm a 405 nm, s linearitou do OD ≥ 2,000).
- Promývačka mikrotitračních destiček (přednostně) pro promývání o objemech 225 - 375 µl.
- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Obvyklé laboratorní sklo: válce, zkumavky, atd.
- Mikropipety pro přesné pipetování 10, 100 a 1000 µl roztoku.
- Rukavice na jedno použití.
- Stopky.
- Roztok chlornanu sodného (5%).
- Nádoby na odkládání potenciálně infekčního materiálu.
- Absorpční papír.

5. UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA REAGENCIÍ
Reagencie musí být uchovávány při 2-8 °C.
Datum exspirace je uvedeno na každé složce a na štítku krabice.

Po otevření nebo po přípravě mají reagencie omezenou stabilitu.

REAGENCIE	PODMÍNKY
Mikrotitrační destička	6 týdnů při 2-8 °C v polyethylenovém sáčku.
Kalibrátory	6 týdnů při 2-8 °C.
Konjugát	6 týdnů při 2-8 °C.
Substrát	až do data exspirace při 2-8 °C, 1 týden při 15-30 °C; uchovávejte v temnu.
Ředící roztok pro vzorky	hotový k použití, 2 týdny při 2-8 °C.
Promývací roztok	2 týdny při 2-8 °C, 5 dnů při 15-30°C..
Zastavovací roztok	až do data exspirace při 2-8 °C.

6. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A OCHRANA ZDRAVÍ

POUZE PRO DIAGNOSTIKU *IN VITRO.*

Tato souprava obsahuje materiály lidského původu, které byly testovány a vykázaly negativní reakci při testech na přítomnost HBs Ag a při testech na protilátky proti HIV-1, HIV-2 a anti-HCV pomocí metod schválených FDA. Vzhledem k tomu, že žádný diagnostický test nemůže poskytnout úplnou jistotu o nepřítomnosti infekčních agens, je nutné zacházet se všemi materiály lidského původu jako s potenciálně infekčními materiály. Při práci s materiály lidského původu musí být dodržována všechna bezpečnostní opatření, která se běžně používají v laboratorní praxi.

Bezpečnostní předpisy a ochrana zdraví

1. Nepipetujte ústy. Při zacházení se vzorky a provádění testu používejte rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Po skončení práce si pečlivě umyjte ruce.
2. Následující reagencie obsahují nízké koncentrace škodlivých nebo dráždivých látek:
   a) Promývací roztok obsahuje detergenty
   b) Konjugát obsahuje fenol
   c) Substrát je kyselina
   d) Kontroly obsahují jako konzervační činidlo 0,09 % azidu sodného, který může reagovat s mědí a olovem v odpadním potrubí za vzniku vysoce výbušných azidů kovů. V případě jejich odložení do výlevky vypláchněte laboratorní potrubí velkým množstvím vody.

   V případě kontaktu jakékoliv reagencie s kůží nebo očima omyjte postiženou oblast velkým množstvím vody.
3. Zařízení, která nejsou po použití určena k likvidaci, musí být po použití sterilizována. Upřednostňovanou metodou je autoklávování po dobu jedné hodiny při 121 °C; materiály určené k likvidaci musí být autoklávovány nebo spáleny.
4. Kyselina sírová obsažená v zastavovacím roztoku a kyselina chlorovodíková používaná k mytí laboratorního skla jsou leptavé kyseliny a je nutné s nimi zacházet s náležitou opatrností. V případě kontaktu s kůží nebo očima důkladně omyjte zasažené místo velkým množstvím vody.
5. Neutralizované kyseliny a ostatní tekutý odpad musí být dekontaminovány přidáním dostatečného množství chlornanu sodného tak, aby konečná koncentrace chlornanu sodného činila minimálně 1,0 %. Pro zajištění účinné dekontaminace je zapotřebí, aby 1% chlornan sodný působil 30 minut.
6. V případě rozlití je nutné potenciálně infekční materiál ihned odstranit absorpčním papírem a zasažená místa se musí před dalším pokračováním v práci otřít například 1,0 % chlornanem sodným. Před použitím chlornanu sodného na místa potřísněná kyselinou je nutné zasažené místo nejprve důkladně vysušit. Materiály použité k očištění potřísněných míst, včetně rukavic, je nutné likvidovat jako potenciálně biologicky nebezpečný odpad. Materiály obsahující chlornan sodný nesmí být autoklávovány.

Analytická upozornění

1. Před použitím nechte všechny reagencie ustálit na pokojovou teplotu (18-30 °C). Ihned po použití vraťte reagencie na místo s teplotou stanovenou pro uchovávání. **Je důležité, aby pracovní postup probíhal při správné teplotě. Zkontrolujte, zda v termostatu není teplota nižší než 35 °C nebo vyšší než 39 °C.** Sáček se stripy ponechejte před otevřením nejméně 30 minut při pokojové teplotě.
2. Nepoužívejte reagencie s prošlým datem exspirace. Je nutné zabránit mikrobiologické kontaminaci reagencií, která by mohla zkrátit životnost výrobku a vést k chybným výsledkům.
3. Neupravujte pracovní postup a nepoužívejte reagencie jiných výrobců nebo reagencie z jiné šarže, pokud není u dané reagencie uvedeno, že je zaměnitelná mezi různými šaržemi. Nezkracujte žádnou předepsanou dobu inkubace.
4. Veškeré laboratorní sklo, které bude použito pro reagencie, musí být důkladně umyto 2 M kyselinou chlorovodíkovou a poté vypláchnuto destilovanou vodou nebo kvalitní deionizovanou vodou.
5. Během uchovávání a během inkubačních kroků nevystavujte reagencie působení silného světla nebo výparům chlornanu.
6. Jednotlivé jamky nesmí během provádění testu vyschnout.
7. Dbejte na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci reagencií. Je důležité, aby pro různé reagencie byly vyhrazeny pipety k výlučnému použití .
8. Dbejte na to, aby nedošlo ke kontaminaci nebo přelití okraje jamek konjugátem. Neodstraňujte jej z destičky foukáním.
9. Při enzymové imunoanalýze může příležitostně docházet k „okrajovému efektu“, který je nutné minimalizovat zvýšením vlhkosti během inkubace. Destičky musí být zakryty víčkem a inkubovány při 37 °C buď ve vodní lázni se stojánkem nebo plovákem sloužícím v případě potřeby ke stabilizaci destičky nebo v inkubátoru. Alternativně je možné destičky inkubovat ve schváleném analyzátoru. V případě zájmu o podrobnější informace si přečtěte příslušný návod k použití. CO_2 inkubátory se nesmí používat.
10. Dbejte na to, aby bylo dno destičky čisté a suché a aby před měřením destičky nebyly na povrchu kapaliny přítomné žádné vzduchové bubliny.
11. Použití silně hemolyzovaných vzorků, neúplně sraženého séra nebo vzorků s mikrobiologickou kontaminací může vést k chybným výsledkům.
12. Ke každému používanému nástroji si pečlivě přečtěte návod k použití daného výrobce, který vám poskytne doplňující informace o následujících bodech:
    - instalace a specifické potřeby
    - zásady, pokyny, upozornění a rizika související s použitím

- specifikace výrobce a účinnost přístrojů
- servis a údržba.

7. TYP A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

Jako vzorek se používá sérum odebrané běžným způsobem z žíly a zpracované za dodržení všech pravidel, které vyžaduje správná laboratorní praxe. Sérum může být uchováváno buď čerstvé po dobu až 4 dnů při 2-8 °C nebo zamražené po delší dobu při –20 °C, přičemž může být zamraženo a rozmraženo maximálně 3 x. Rozmražené vzorky je nutné před použitím pečlivě protřepat. Kvalita vzorků může být významně ovlivněna mikrobiální kontaminací, která vede k chybným výsledkům.
Silně lipemické, ikterické nebo kontaminované vzorky se nesmí používat. Jestliže není možné získat nový vzorek, musí být takové vzorky vyčeřeny filtrací (0,45 µm) nebo centrifugací.
Test nelze provádět s lidskou plazmou.

8. PRACOVNÍ POSTUP

Manuální technika

- Připravte si požadovaný počet stripů.
- Připravte promývací roztok o pracovní koncentraci naředěním 10x koncentrovaného promývacího roztoku (100 ml + 900 ml H_2O).
- Připravte požadovaný ředící roztok pro vzorky smícháním 1 dílu 50x koncentrovaného ředícího roztoku a 49 dílů naředěného promývacího roztoku (příklad: 2 ml + 98 ml naředěného promývacího roztoku).

Nařeďte vzorky v poměru 1:101 přidáním 10 µl séra do 1 ml ředícího roztoku. Do jednotlivých jamek napipetujte po 100 µl od každého ředění vzorku (doporučuje se testovat vzorky dvojmo). Do jednoho stripu napipetujte (pokud možno dvojmo) NEŘEDĚNÉ kalibrátory (100 µl do každé jamky). Ponechte jednu jamku prázdnou pro slepý pokus tvořený 100 µl substrátového roztoku.
Jamky zakryjte ochrannou fólií a inkubujte 45 minut při 37 °C. Promyjte čtyřikrát po dobu 30 sekund (300 µl), napipetujte do každé jamky 100 µl konjugátu, zakryjte jamky ochrannou fólií a inkubujte znovu po dobu 45 minut při 37 °C. Destičky znovu čtyřikrát promyjte dle výše uvedeného postupu. Poté napipetujte do každé jamky 100 µl substrátu.
Po 15 minutách při pokojové teplotě zastavte enzymatickou reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku. Absorbance (OD) se měří do 30 minut při 450 nm nebo při 450/620 nm. Jestliže je OD vyšší než 2,000, proveďte měření znovu při 405 nm.

9. Schéma pracovního postupu pro soupravu CYTOMEGALOVIRUS IgG

Manuální technika

KROK 1 Do jednotlivých jamek destičky napipetujte po 100 µl naředěného vzorku nebo kontroly.
Inkubujte 45 minut při 37 °C.
Promyjte 4krát (300 µl).

KROK 2 Do každé jamky napipetujte 100 µl konjugátu.
Inkubujte 45 minut při 37 °C.
Promyjte 4 x (300 µl).

KROK 3 Do každé jamky napipetujte 100 µl substrátu.
Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.

KROK 4 Napipetujte 100 µl zastavovacího roztoku.
Do 30 minut změřte absorbanci při 450 nm.

10. VALIDACE TESTU

1. **KONTROLA -** (Kalibrátor 0): OD negativní kontroly musí být nižší než 0,6 x OD kalibrátoru 2.
2. OD kalibrátoru 2 musí být ≥ 0,2 při 450 nm; ≥ 0,16 při 450/620 nm.
3. OD kalibrátoru 5 musí být vyšší než 1,2.

11. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

KVANTITATIVNÍ VÝSLEDKY

Vyneste do grafu hodnoty OD kalibrátorů zmenšené o OD blanku (≤ 0,150). Odpovídající titr testovaného vzorku lze získat extrapolací.

POZNÁMKA: Pro každý běh testu je třeba vytvořit standardní křivku.

Je-li OD některého vzorku nebo kalibrátoru vyšší než 2,0, proveďte měření při 405 nm a vynásobte hodnotu třemi.

Konverze OD na jednotky/ml

IgG protilátky proti cytomegaloviru lze vyjádřit v jednotkách EU/ml (arbitrážní jednotky) nebo v IU/ml (navrhovaný standard WHO pro anti-CMV IgG) na základě extrapolace výsledků 6 kalibrátorů a porovnání OD vzorku se získanou křivkou.

Tabulka 1: Hodnoty kalibrátorů v arbitrážních a mezinárodních jednotkách

	EU/mL	IU/mL
Kalibrátor 0	0	0
Kalibrátor 1	5	0,5
Kalibrátor 2	10	1
Kalibrátor 3	50	5
Kalibrátor 4	100	10
Kalibrátor 5	200	20

Stav imunity lze interpretovat takto:

IMUNNÍ: jestliže je koncentrace IgG protilátek proti Cytomegaloviru ve vzorku > 12 EU/ml nebo 1,2 IU/ml

NEIMUNNÍ: jestliže je koncentrace IgG protilátek proti Cytomegaloviru < 8 EU/ml nebo < 0,8 IU/ml

NEJISTÝ: pokud je výsledek mezi těmito dvěma hodnotami. V takovém případě se doporučuje zopakovat test dvojmo.

KVALITATIVNÍ VÝSLEDKY

Vypočítejte poměr mezi hodnotou OD vzorku a OD cut-off kontroly (kalibrátor 2). Vzorek se hodnotí jako:

Pozitivní: pokud je poměr > 1,2.

Nejistý: > 0,8 a < 1,2.

Negativní: pokud je poměr < 0,8.

Pokud je výsledek nejistý, proveďte test znovu. Pokud pochybnosti přetrvávají, odeberte nový vzorek séra.

12. OMEZENÍ TESTU

Vzorek séra získaného během akutní fáze infekce, kdy jsou přítomné pouze protilátky třídy IgM, může být negativní při použití tohoto testu.

Tepelná inaktivace testovaného séra nevede k chybným výsledkům při stanovení anti-CMV IgG, jako je tomu v případě anti-CMV IgM.

Hladiny IgM proti cytomegaloviru musí být stanoveny pomocí soupravy Platelia™ CMV IgM. Alternativně je možné souběžně vyšetřit druhý vzorek séra, odebraný přibližně o 8-14 dnů později, ke stanovení nárůstu hladin protilátek IgG.

Výsledek testu se musí posuzovat v kombinaci s informacemi získanými vyhodnocením anamnézy a ostatních diagnostických postupů.

13. ANALYTICKÁ SPECIFIČNOST

Bylo testováno 23 vzorků negativních na CMV, avšak obsahujících protilátky IgG proti virům, jako jsou např. virus zarděnek, virus Epstein Barrové, Herpes simplex, virus spalniček nebo příušnic. Přítomnost uvedených protilátek neovlivňovala v žádném případě test.

14. DIAGNOSTICKÁ CITLIVOST A SPECIFIČNOST

V klinickém hodnocení provedeném v nemocniční laboratoři bylo analyzováno celkem 264 vzorků, z nichž 47 bylo shledáno jako negativní a 217 jako pozitivní. Vzorky byly analyzovány pomocí jiné komerčně dostupné imunoenzymatické metody: mezi oběma metodami byla zjištěna 100% shoda, jak u pozitivních, tak i u negativních vzorků.

Souprava Platelia™ CMV IgG vykazuje 100% senzitivitu a specifičnost.

15. PŘESNOST

Tabulka 2: Opakovatelnost testu stanovená na třech různých šaržích

Cut Off *n=21*	*Šarže* *č. 104*	*Šarže* *č. 105*	*Šarže* *č. 106*
OD	0,453	0,374	0,433
CV %	4,62	4,73	4,07

Tabulka 3: Reprodukovatelnost testu

	EU/ml			
Vzorek	**Běh I**	**Běh II**	**Běh III**	**CV%**
Č.1	12,6	17,5	17,6	18
Č.2	78,5	87,5	96,3	10

16. POMŮCKA PRO ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

PROBLÉM	MOŽNÝ ZDROJ	KONTROLA NEBO NÁPRAVNÁ AKCE
Neplatný test (všechny výsledky negativní)	Vynechání jedné reagencie či více reagencií nebo přidání jedné reagencie či více reagencií ve špatném pořadí.	Zkontrolujte pracovní postup Zkontrolujte nepoužité roztoky. Zopakujte test.
	Destička nevykazuje reakci.	Zkontrolujte kód na obale použité destičky (informace o správném kódovém označení jsou uvedeny v bodě 4 příbalovéhoi letáku).
		Zkontrolujte vlhkost nepoužité destičky. (silikagelový desikant musí být světle žlutý). Zopakujte test.
Neplatný test (všechny výsledky pozitivní).	Kontaminace substrátu.	Použijte novou alikvótní část substrátu.
	Nedostatečné promytí.	Zkontrolujte, zda promývačka funguje správně.
Špatná přesnost	Neúplné promytí jamek.	Zkontrolujte, zda promývačka funguje správně.
	Nedostatečné odsátí jamek.	Zkontrolujte, zda promývačka funguje správně.
	Chyba při pipetování.	Zkontrolujte funkci pipety.
	Příliš pomalé napipetování reagencie.	Zamezte vyschnutí destičky po promývacím kroku. Reagencie přidejte ihned.
	Přítomnost bublin.	Zamezte vzniku vzduchových bublin při pipetování.
	Znečištění optické dráhy.	Zkontrolujte, zda není znečištěn světelný zdroj nebo detektor přístroje. Otřete spodní část destičky měkkou tkaninou.
Neadekvátní vyvíjení barvy	Nesprávná doba nebo teplota inkubace.	Zkontrolujte zařízení pro regulaci teploty a měření času.
		Dodržte přesně doporučený návod k použití.
	Přidání nesprávného objemu substrátu na destičku	Zkontrolujte funkci pipety.

17. LITERATURA

Viz anglická verze.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Cocuqette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33



12/2004



PLATELIA™ CMV IgG

96 TESTOV 72680

IMUNOENZYMATICKÁ METÓDA NA KVALITATÍVNE A KVANTITATÍVNE STANOVENIE PROTILÁTOK TRIEDY IgG PROTI CYTOMEGALOVÍRUSU V ĽUDSKOM SÉRE



OBSAH

1. POUŽITIE

IMUNOENZYMATICKÁ METÓDA NA KVALITATÍVNE A KVANTITATÍVNE STANOVENIE PROTILÁTOK TRIEDY IgG PROTI CYTOMEGALOVÍRUSU V ĽUDSKOM SÉRE

2. KLINICKÝ VÝZNAM

Cytomegalovírus je herpes vírus prenášaný blízkym kontaktom medzi ľuďmi. Vo väčšine prípadov nie sú zjavné žiadne príznaky infekcie. Vírus je však veľmi nebezpečný a môže byť fatálny u imunodeprimovaných pacientov. Séronegatívne ženy, ktoré sa infikujú v priebehu tehotenstva, môžu prenášať ochorenie na plod. V 95 % prípadov prebehne tento proces bez príznakov, u niektorých novorodencov sa však môže objaviť žltačka, hepatosplenomegália a retardácia psychomotorického vývoja. Preto je veľmi dôležité stanoviť imunitný stav pacientky a kontrolovať sérokonverziu. Výrazné zvýšenie titra IgG protilátok proti cytomegalovírusu signalizuje prebiehajúcu infekciu alebo reaktiváciu latentnej infekcie.

3. PRINCÍP TESTU

Test je založený na technike ELISA (enzýmová imunosorbčná analýza) (1-7).
Antigén, zložený z čiastočne purifikovaného a inaktivovaného cytomegalovírusu, je naviazaný na pevnú fázu (8 jamkové stripy). Špecifické imunoglobulíny sa viažu k antigénu počas inkubácie s narieденým ľudským sérom.
Po premytí, ktorým sa odstránia nereagujúce proteíny, sa uskutočňuje inkubácia s konjugátom, tvoreným monoklonálnou protilátkou proti ľudskému IgG, označenou chrenovou peroxidázou.
Nenaviazaný konjugát sa odstráni a pridá sa substrát pre peroxidázu.
Modré sfarbenie, ktoré sa vyvinie, je úmerné koncentrácii špecifických protilátok prítomných vo vzorke séra. Po prerušení enzymatickej reakcie pridaním roztoku kyseliny sírovej je možné žlté sfarbenie, ktoré vznikne, ľahko vyhodnotiť pomocou spektrofotometra na mikrotitračné platničky.

4. OBSAH SÚPRAVY A PRÍPRAVA REAGENCIÍ

- Reagencie postačujú na 96 stanovení

Pred použitím nechajte ustáliť na izbovú teplotu.

MT PLATE *MIKROTITRAČNÁ PLATNIČKA. 12 x 8 jamiek potiahnutých cytomegalovírusom.*
Použitie: otvorte obal na protiľahlej strane kódového označenia (písmeno C a číslo šarže), ktoré slúži na identifikáciu, vyberte rámik a stripy z fóliového obalu, vložte nepoužité stripy do polyetylénového sáčku so silikagélom, zo sáčku vytlačte vzduch a nepriedušne ho uzavrite pritlačením uzáveru.

CAL *KALIBRÁTORY 5 x 1,6 ml*
Obsah: Nariedené ľudské sérum obsahujúce známe koncentrácie anti-CMV IgG protilátok v 0,01 mol/l fosfátovom pufri s 1 % BSA a 0,09 % azidu sodného, tekuté, pripravené na použitie bez ďalšieho riedenia. Hodnoty možno vyjadriť buď v jednotkách IU/ml alebo EU/ml (vid prevodná tabuľka v kapitole 11). Kalibrátor 2 (1 IU/ml alebo 10 EU/ml) odpovedá hodnote cut-off a môže byť použitý v kvalitatívnom teste. Kalibrátory majú nasledujúce hodnoty: 0,5; 1; 5; 10; 20 IU/ml. Sú pripravené titráciou podľa „**Proposed International Standard WHO“.**
Farba: farba kalibrátorov je úmerná relatívnemu titru protilátok.

CONJ *KONJUGÁT 1 x 16 ml*
Obsah: monoklonálne protilátky označené peroxidázou, vo fosfátovom pufri obsahujúcom 0,05 % fenolu a 0,02 % Bronidoxu. Pripravený na použitie bez ďalšieho riedenia.

CONTROL IgG- *IgG NEGATÍVNA KONTROLA (PF93910) 1 x 1,6 ml*
ZAMENITEĽNÉ MEDZI ŠARŽAMI
Obsah: Ľudské sérum bez obsahu anti-CMV IgG protilátok, nariedené v 0,01 mol/l vo fosfátovom pufri s 1 % BSA a 0,09 % azidu sodného, tekuté, pripravené na použitie bez ďalšieho riedenia (kalibrátor 0).
Stabilita: neotvorený výrobok uložený pri teplote 2-8 °C je stabilný až do exspirácie.

WASH BUF 10x *PREMÝVACÍ ROZTOK 10X (PF93603). 1 x 100 ml*
ZAMENITEĽNÉ MEDZI ŠARŽAMI
Obsah: 10x koncentrovaný fyziologický roztok, pufrovaný fosfátmi; obsahuje 0,5 % Brij.
Príprava: Premývací roztok o pracovnej koncentrácii pripravte nariedením príslušného objemu v pomere 1:10. Ak sú prítomné kryštály, rozpustite ich pri 37 °C.

SAMP DIL 50x *RIEDIACI ROZTOK 50X (PF93601). 1 x 4,5 ml. Na riedenie vzoriek séra.*
ZAMENITEĽNÉ MEDZI ŠARŽAMI
Obsah: 50x koncentrovaný roztok s obsahom 0,05 % fenolu a 0,02 % Bronidoxu.
Príprava: Riediaci roztok o pracovnej koncentrácii pripravte nariedením príslušného objemu v pomere 1:50 v premývacom roztoku.

SUBS TMB *SUBSTRÁT (PF93619). 12 ml. Pripravený na použitie.* ***ZAMENITEĽNÉ MEDZI ŠARŽAMI***
Obsah: Tetramethylbenzidín 0,26 mg/ml a peroxid vodíka 0,01 % stabilizovaný v citrátovom pufri 0,05 mol/l (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *ZASTAVOVACÍ ROZTOK (PF93602). 1 x 16 ml*. **ZAMENITEĽNÉ MEDZI ŠARŽAMI**
0,3 mol/l H_2SO_4 v roztoku pripravenom na použitie.

SAMOLEPIACA FÓLIA (2).
POLYETYLÉNOVÝ SÁČOK (1).

MATERIÁL POTREBNÝ NA USKUTOČNENIE TESTU, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU DODÁVKY.
- Inkubátor s reguláciou teploty na 37 °C.
- Spektrofotometer na mikrotitračné platničky (vlnová dĺžka 450 nm alebo 450/620 nm a 405 nm, s lineárnosťou do OD ≥ 2,000).
- Premývačka mikrotitračných platničiek (prednostne) na premývanie o objemoch 225 - 375 µl.
- Destilovaná alebo deionizovaná voda.
- Obvyklé laboratórne sklo: valce, skúmavky, atď.
- Mikropipety na presné pipetovanie 10, 100 a 1000 µl roztoku.
- Rukavice na jedno použitie.
- Stopky.
- Roztok chlórnanu sodného (5%).
- Nádoby na odkladanie potenciálne infekčného materiálu.
- Absorpčný papier.

5. UCHOVÁVANIE A STABILITA REAGENCIÍ
Reagencie musia byť uchovávané pri 2-8 °C.
Dátum exspirácie je uvedený na každej zložke a na štítku krabice.

Po otvorení alebo po príprave majú reagencie obmedzenú stabilitu.

REAGENCIE	**PODMIENKY**
Mikrotitračná platnička	6 týždňov pri 2-8 °C v polyetylénovom sáčku.
Kalibrátory	6 týždňov pri 2-8 °C.
Konjugát	6 týždňov pri 2-8 °C.
Substrát	až do dátumu exspirácie pri 2-8 °C, 1 týždeň pri 15-30 °C; uchovávajte v tme.
Riediaci roztok na vzorky	pripravený na použitie, 2 týždne pri 2-8 °C.
Premývací roztok	2 týždne pri 2-8 °C, 5 dní pri 15-30°C.
Zastavovací roztok	až do dátumu exspirácie pri 2-8 °C.

6. BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A OCHRANA ZDRAVIA

VÝHRADNE PRE DIAGNOSTIKU *IN VITRO.*

Táto súprava obsahuje materiály ľudského pôvodu, ktoré boli testované a vykázali negativitu na prítomnosť HBsAg a na protilátky proti HIV-1, HIV-2 a HCV pomocou metód schválených FDA. Vzhľadom na to, že žiadny diagnostický test nemôže poskytnúť úplnú istotu o neprítomnosti infekčných zložiek, je nutné zaobchádzať so všetkými materiálmi ľudského pôvodu ako by boli potenciálne infekčné. Pri práci s materiálmi ľudského pôvodu musia byť dodržované všetky bezpečnostné opatrenia, ktoré sa bežne používajú v laboratórnej praxi.

Bezpečnostné predpisy a ochrana zdravia

1. Nepipetujte ústami. Pri zaobchádzaní so vzorkami a uskutočňovaní testu používajte jednorázové rukavice a ochranné okuliare. Po skončení práce si dôkladne umyte ruky.
2. Nasledujúce reagencie obsahujú nízke koncentrácie škodlivých alebo dráždivých látok:
   a) Premývací roztok obsahuje detergenty
   b) Konjugát obsahuje fenol
   c) Substrát je kyselina
   d) Ako konzervačné činidlo obsahujú kontroly 0,09 % azidu sodného, ktorý môže reagovať s meďou a olovom v odpadovom potrubí za vzniku vysoko výbušných azidov kovov. V prípade ich vyliatia do výlevky vypláchnite laboratórne potrubie veľkým množstvom vody.

   V prípade kontaktu akejkoľvek reagencie s kožou alebo očami omyte postihnutú oblasť veľkým množstvom vody.
3. Zariadenia, ktoré nie sú po použití určené na likvidáciu, musia byť po použití sterilizované. Uprednostíňovanou metódou je autoklávovanie po dobu jednej hodiny pri 121 °C; materiály určené na likvidáciu sa musia autoklávovať alebo spáliť.
4. Kyselina sírová obsiahnutá v zastavovacom roztoku a kyselina chlorovodíková používaná na umývanie laboratórneho skla sú leptavé kyseliny, a je nutné s nimi zaobchádzať s náležitou opatrnosťou. V prípade kontaktu s kožou alebo očami zasiahnuté miesto dôkladne omyte veľkým množstvom vody.
5. Neutralizované kyseliny a ostatný tekutý odpad musia byť dekontaminované pridaním dostatočného množstva chlórnanu sodného tak, aby konečná koncentrácia chlórnanu sodného bola minimálne 1,0 %. Pre zaistenie účinnej dekontaminácie je potrebné, aby 1% chlórnan sodný pôsobil 30 minút.
6. V prípade rozliatia je nutné potenciálne infekčný materiál ihneď odstrániť absorpčným papierom a zasiahnuté miesta sa musia pred ďalším pokračovaním v práci otrieť napríklad 1,0 % chlórnanom sodným. Pred použitím chlórnanu sodného na miestach postriekaných kyselinou je nutné zasiahnuté miesta najprv dôkladne vysušiť. Materiály použité na očistenie postriekaných miest, vrátane rukavíc, je nutné likvidovať ako potenciálne biologicky nebezpečný odpad. Materiály obsahujúce chlórnan sodný nesmú byť autoklávované.

Analytické upozornenia

1. Pred použitím nechajte všetky reagencie vytemperovať na izbovú teplotu (18-30 °C). Reagencie ihneď po použití vráťte na miesto s teplotou stanovenou pre ich uchovávanie. **Je dôležité, aby pracovný postup prebiehal pri správnej teplote. Skontrolujte, či v termostate nie je teplota nižšia než 35 °C alebo vyššia než 39 °C.** Sáčok so stripmi ponechajte pred otvorením najmenej 30 minút pri izbovej teplote.
2. Nepoužívajte reagencie po dátume exspirácie. Je nutné zabrániť mikrobiologickej kontaminácii reagencií, ktorá by mohla skrátiť životnosť výrobku a viesť ku chybným výsledkom.
3. Neupravujte pracovný postup a nepoužívajte reagencie iných výrobcov alebo reagencie z inej šarže, pokiaľ nie je pri danej reagencii uvedené, že je zameniteľná medzi rôznymi šaržami. Neskracujte žiadnu predpísanú dobu inkubácie.
4. Všetko laboratórne sklo, ktoré bude použité na reagencie, musí byť dôkladne umyté 2 M kyselinou chlorovodíkovou a potom vypláchnuté destilovanou vodou alebo kvalitnou deionizovanou vodou.
5. V priebehu uchovávania a počas inkubačných krokov nevystavujte reagencie pôsobeniu silného svetla alebo výparom chlórnanu.
6. Jednotlivé jamky nesmú v priebehu uskutočňovania testu vyschnúť.
7. Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii reagencií. Je dôležité, aby pre rôzne reagencie boli vyhradené pipety na výlučné použitie .
8. Dbajte na to, aby nedošlo ku kontaminácii alebo preliatiu okraja jamiek konjugátom. Neodstraňujte ho z platničky fúkaním.
9. Pri enzýmovej imunoanalýze môže príležitostne dochádzať k „okrajovému efektu“, ktorý je nutné minimalizovať zvýšením vlhkosti v priebehu inkubácie. Platničky musia byť zakryté viečkom a inkubované pri 37 °C buď vo vodnom kúpeli so stojanom alebo plavákom slúžiacim pre prípad potreby na stabilizáciu platničky alebo v inkubátore. Platničky je alternatívne možné inkubovať vo schválenom analyzátore. V prípade záujmu o získanie podrobnejších informácií si prečítajte príslušný návod na použitie. Nesmú sa používať CO_2 inkubátory .
10. Dbajte na to, aby dno platničky bolo čisté a suché a aby pred meraním platničky neboli na povrchu kvapaliny prítomné žiadne vzduchové bubliny.
11. Použitie silno hemolyzovaných vzoriek, neúplne zrazeného séra alebo vzoriek s mikrobiologickou kontamináciou môže viesť ku chybným výsledkom.
12. Ku každému používanému nástroju si podrobne prečítajte návod na použitie daného výrobcu, ktorý vám poskytne doplňujúce informácie o nasledujúcich bodoch:
    - inštalácia a špecifické potreby

- zásady, pokyny, upozornenia a riziká, ktoré súvisia s použitím
- špecifikácia výrobcu a účinnosť prístrojov
- servis a údržba.

7. TYP A UCHOVÁVANIE VZORIEK

Ako vzorka sa používa sérum odobraté bežným spôsobom zo žily a spracované pri dodržaní všetkých pravidiel, ktoré vyžaduje správna laboratórna prax. Sérum môže byť uchovávané buď čerstvé po dobu až 4 dní pri 2-8 °C alebo zamrazené po dlhšiu dobu pri –20 °C, pričom môže byť zmrazené a rozmrazené maximálne 3x. Rozmrazené vzorky je nutné pred použitím dôkladne pretrepať. Kvalitu vzoriek môže významne ovplyvniť mikrobiálna kontaminácia, ktorá môže spôsobiť chybné výsledky.
Nesmú sa používať silno lipemické, ikterické alebo kontaminované vzorky. Ak nie je možné získať novú vzorku, musia byť také vzorky vyčírené filtráciou (0,45 µm) alebo centrifugáciou.
Test nie je možné robiť s ľudskou plazmou.

8. PRACOVNÝ POSTUP

Manuálna technika

- Pripravte si požadovaný počet stripov.
- Pripravte premývací roztok o pracovnej koncentrácii nariedením 10x koncentrovaného premývacieho roztoku (100 ml + 900 ml H_2O).
- Pripravte požadovaný riediaci roztok na vzorky zmiešaním 1 dielu 50x koncentrovaného riediaceho roztoku a 49 dielov nariedeného premývacieho roztoku (príklad: 2 ml + 98 ml nariedeného premývacieho roztoku).

Narieďte vzorky v pomere 1:101 pridaním 10 µl séra do 1 ml riediaceho roztoku. Do jednotlivých jamiek napipetujte po 100 µl z každého riedenia vzorky (doporučuje sa vzorky testovať dvojmo). Do jedného stripu napipetujte (pokiaľ možno dvojmo) NERIEDENÉ kalibrátory (100 µl do každej jamky). Nechajte jednu jamku prázdnu na slepý pokus tvorený 100 µl substrátového roztoku.
Jamky zakryte ochrannou fóliou a inkubujte 45 minút pri 37 °C. Premyte štyri krát po dobu 30 sekúnd (300 µl), napipetujte do každej jamky 100 µl konjugátu, zakryte jamky ochrannou fóliou a inkubujte znovu po dobu 45 minút pri 37 °C. Platničky znovu štyri krát premyte podľa vyššie uvedeného postupu. Potom do každej jamky napipetujte 100 µl substrátu.
Po 15 minútach pri izbovej teplote zastavte enzymatickú reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku.
Absorbancia (OD) sa meria do 30 minút pri 450 nm alebo pri 450/620 nm. Ak je OD vyššia než 2,000, urobte meranie znovu pri 405 nm.

9. Schéma pracovného postupu pre súpravu CYTOMEGALOVIRUS IgG

Manuálna technika

KROK 1	Do jednotlivých jamiek platničky napipetujte po 100 µl nariedenej vzorky alebo kontroly. Inkubujte 45 minút pri 37 °C. Premyte 4x (300 µl).
KROK 2	Do každej jamky napipetujte 100 µl konjugátu. Inkubujte 45 minút pri 37 °C. Premyte 4x (300 µl).
KROK 3	Do každej jamky napipetujte 100 µl substrátu. Inkubujte 15 minút pri izbovej teplote.
KROK 4	Napipetujte 100 µl zastavovacieho roztoku. Do 30 minút zmerajte absorbanciu pri 450 nm.

10. VALIDÁCIA TESTU

1. **KONTROLA -** (Kalibrátor 0): OD negatívnej kontroly musí byť nižšia než 0,6 x OD kalibrátora 2.

2. OD kalibrátora 2 musí byť ≥ 0,2 pri 450 nm; ≥ 0,16 pri 450/620 nm.
3. OD kalibrátora 5 musí byť vyššia než 1,2.

11. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

KVANTITATÍVNE VÝSLEDKY

Vyneste do grafu hodnoty OD kalibrátorov zmenšené o OD blanku (≤ 0,150). Odpovedajúci titer testovanej vzorky možno získať extrapoláciou.

POZNÁMKA: Pre každý beh testu je potrebné vytvoriť štandardnú krivku.

Ak je OD niektorej vzorky alebo kalibrátora vyššia než 2,0, urobte meranie pri 405 nm a vynásobte hodnotu tromi.

Konverzia OD na jednotky/ml

IgG protilátky proti cytomegalovírusu možno vyjadriť v jednotkách EU/ml (arbitrážne jednotky) alebo v IU/ml (navrhovaný štandard WHO pre anti-CMV IgG) na základe extrapolácie výsledkov 6 kalibrátorov a porovnania OD vzorky so získanou krivkou.

Tabuľka 1: Hodnoty kalibrátorov v arbitrážnych a medzinárodných jednotkách

	EU/ml	IU/ml
Kalibrátor 0	0	0
Kalibrátor 1	5	0,5
Kalibrátor 2	10	1
Kalibrátor 3	50	5
Kalibrátor 4	100	10
Kalibrátor 5	200	20

Stav imunity možno interpretovať takto:

IMÚNNY: ak je koncentrácia IgG protilátok proti Cytomegalovírusu vo vzorke > 12 EU/ml alebo 1,2 IU/ml.

NEIMÚNNY: aj je koncentrácia IgG protilátok proti Cytomegalovírusu < 8 EU/ml alebo < 0,8 IU/ml.

NEISTÝ: v prípade, že výsledok je medzi týmito dvomi hodnotami. V takom prípade sa doporučuje test zopakovať dvojmo.

KVALITATÍVNE VÝSLEDKY

Vypočítajte pomer medzi hodnotou OD vzorky a OD cut-off kontroly (kalibrátor 2). Vzorka sa hodnotí ako:

Pozitívna: ak je pomer > 1,2.

Neistá: > 0,8 a < 1,2.

Negatívna: ak je pomer < 0,8.

Ak je výsledok neistý, urobte test znovu. V prípade, že pochybnosti pretrvávajú, odoberte novú vzorku séra.

12. OBMEDZENIA TESTU

Vzorka séra získaného v priebehu akútnej fázy infekcie, kedy sú prítomné len protilátky triedy IgM, môže byť pri použití tohto testu negatívna.

Tepelná inaktivácia testovaného séra nevedie pri stanovení anti-CMV IgG ku chybným výsledkom, ako je to v prípade anti-CMV IgM.

Hladiny IgM proti cytomegalovírusu musia byť stanovené pomocou súpravy Platelia™ CMV IgM. Alternatívne je možné súbežne vyšetriť druhú vzorku séra, odobratú približne o 8-14 dní neskôr, na stanovenie nárastu hladín protilátok IgG.

Výsledok testu sa musí posudzovať v kombinácii s informáciami získanými vyhodnotením anamnézy a ostatných diagnostických postupov.

13. ANALYTICKÁ ŠPECIFICITA

Testovalo sa 23 vzoriek negatívnych na CMV, avšak obsahujúcich protilátky IgG proti vírusom, ako sú napr. vírus ružienky, Epstein Barrovej vírus, Herpes simplex, vírus osýpok alebo mumpsu. Prítomnosť uvedených protilátok neovplyvňovala test v žiadnom z uvedených prípadov.

14. DIAGNOSTICKÁ CITLIVOSŤ A ŠPECIFICITA

V klinickom hodnotení uskutočnenom v nemocničnom laboratóriu sa analyzovalo celkom 264 vzoriek, z ktorých 47 bolo analyzovaných s negatívnym a 217 s pozitívnym výsledkom. Vzorky boli analyzované

pomocou inej komerčne dostupnej imunoenzymatickej metódy: medzi obidvomi metódami bola zistená 100% zhoda, a to ako u pozitívnych, tak aj u negatívnych vzoriek.

Súprava Platelia™ CMV IgG vykazuje 100% senzitivitu a špecificitu.

15. PRESNOSŤ

Tabuľka 2: Opakovateľnosť testu stanovená pre tri rôzne šarže

Cut Off ***n=21***	***Šarža*** ***č. 104***	***Šarža*** ***č. 105***	***Šarža*** ***č. 106***
OD	0,453	0,374	0,433
CV %	4,62	4,73	4,07

Tabuľka 3: Reprodukovatelnosť testu

	EU/ml			
Vzorka	**Beh I**	**Beh II**	**Beh III**	**CV%**
Č.1	12,6	17,5	17,6	18
Č.2	78,5	87,5	96,3	10

16. POMÔCKA NA RIEŠENIE PROBLÉMOV

PROBLÉM	**MOŽNÝ ZDROJ**	**KONTROLA ALEBO NÁPRAVNÁ AKCIA**
Neplatný test (všetky výsledky negatívne)	Vynechanie jednej alebo viacerých reagencií alebo pridanie jednej reagencie prípadne viacerých reagencií v chybnom poradí.	Skontrolujte pracovný postup. Skontrolujte nepoužité roztoky. Zopakujte test.
	Platnička nevykazuje reakciu.	Skontrolujte kód na obale použitej platničky (informácie o správnom kódovom označení sú uvedené v bode 4 príbalového letáku).
		Skontrolujte vlhkosť nepoužitej platničky (silikagélový absorbent musí byť svetložltý). Zopakujte test.
Neplatný test (všetky výsledky pozitívne).	Kontaminácia substrátu.	Použite novú alikvotnú časť substrátu.
	Nedostatočné premytie.	Skontrolujte, či správne funguje premývačka.
Zlá presnosť	Neúplne premytie jamiek.	Skontrolujte, či správne funguje premývačka.
	Nedostatočné odsatie jamiek.	Skontrolujte, či správne funguje premývačka.
	Chyba pri pipetovaní.	Skontrolujte funkciu pipety.
	Príliš pomalé napipetovanie reagencie.	Zabráňte vyschnutiu platničky po premývacom kroku. Reagencie pridajte ihneď.
	Prítomnosť bublín.	Zabráňte vzniku vzduchových bublín pri pipetovaní.
	Znečistenie optickej dráhy.	Skontrolujte, či nie je znečistený svetelný zdroj alebo detektor prístroja. Mäkkou tkaninou otrite spodnú časť platničky.
Neadekvátne vyvíjanie farby	Nesprávna dĺžka alebo teplota inkubácie.	Skontrolujte zariadenie na reguláciu teploty a merania času.
		Presne dodržte doporučený návod na použitie.
	Pridanie nesprávneho objemu substrátu na platničku	Skontrolujte funkciu pipety.

17. LITERATÚRA

Viď anglickú verziu.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Cocuqette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33



BIO-RAD

PLATELIA™ CMV IgG

96 TESZT 72680

CITOMEGALOVÍRUS ELLENI IgG OSZTÁLYÚ ELLENANYAGOK KVALITATÍV ÉS KVANTITATÍV KIMUTATÁSA HUMÁN SZÉRUMBAN ENZIM-IMMUNASSAY MÓDSZERREL

IVD

Minden általunk gyártott és forgalomba hozott termék minőségbiztosítási rendszer keretén belül készült, a nyersanyag átvételétől kezdve a termék forgalmazásáig.
Minden egyes gyártási sorozat minőségét ellenőrizzük, és csak akkor hozzuk forgalomba, ha az megfelel az előre felállított kritériumoknak.
Minden sorozat gyártási és minőségellenőrzési jegyzőkönyve megtalálható cégünknél.

TARTALOM

1. ALKALMAZÁS

CYTOMEGALOVÍRUS ELLENI IgG OSZTÁLYÚ ELLENANYAGOK KVALITATÍV ÉS KVANTITATÍV KIMUTATÁSA HUMÁN SZÉRUMBAN ENZIM IMMUNASSAY MÓDSZERREL

2. KLINIKAI JELENTŐSÉG

A Cytomegalovírus szoros emberi kontaktussal közvetített herpes vírus. Az esetek túlnyomó többségében nem jár tünetekkel. Mindazonáltal nagyon veszélyes, és legyengült immunrendszerű emberek esetében halálos is lehet. A terhesség során megfertőződött szeronegatív asszonyok átvihetik a betegséget a magzatra. Az esetek 95%-ában ez tünetmentesen történik, de egyes újszülöttekben sárgaságot, máj- és lépmegnagyobbodást, és pszihomotoros retardációt idézhet elő. Ezért nagyon fontos a beteg immunstátuszának meghatározása, és a szerokonverzió vizsgálata. Az anti-Cytomegalovírus IgG titer szignifikánsan emelkedése a közelmúltban bekövetkezett fertőzésre, vagy lappangó fertőzés kiújulására utal.

3. A VIZSGÁLAT ALAPELVE

A teszt ELISA technikán (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) alapul (1-7).
A szilárd fázis részlegesen tisztított és inaktivált cytomegalovírusból álló antigénnel borított 8-tesztlyukas tesztcsík. A specifikus immunglobulinok a hígított humán szérummal együtt történő inkubálás során kapcsolódnak az antigénhez.
A nem kötődött fehérjék eltávolítására alkalmazott mosás után torma-peroxidázzal jelölt humán IgG monoklonális antitesteket tartalmazó konjugáttal inkubáljuk. A szabadon maradt konjugátot eltávolítjuk, majd bemérjük a peroxidáz szubsztrátját.
A kifejlődő kék szín intenzitása arányos a szérummintában található specifikus antitestek koncentrációjával. Az enzimreakciót kénsav oldat hozzáadásával leállítjuk és a létrejövő sárga szín intenzitását lemezleolvasó fotométerrel határozzuk meg.

4. A KIT TARTALMA ÉS A REAGENSEK ELKÉSZÍTÉSE

A reagensek mennyisége 96 meghatározásra elegendő.

Használatba vétel előtt hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni a reagenseket.

MT PLATE — **MICROPLATE: Cytomegalovírussal bevont tesztcsíkok, 12x8 tesztlyuk**
Alkalmazás: Az azonosítást szolgáló kódszámmal (C, majd lotszám) ellentétes oldalán nyissuk fel a csomagot. Vegyük ki a keretet és a szükséges számú tesztcsíkot a fóliából. A fölösleges csíkokat tegyük vissza a szilikagélt tartalmazó polietilén tasakba, nyomjuk ki belőle a levegőt, majd a zárórész összenyomásával légmentesen zárjuk le.

CAL — ***KALIBRÁTOR OLDATOK: 5 x 1.6 ml***
Tartalma: ismert koncentrációjú Anti-CMV IgG-t tartalmazó hígított humán szérum 0.01 mol/l foszfát pufferben, amely 1% BSA-t és 0.09% nátrium-azidot tartalmaz. Hígítás nélkül azonnal felhasználható. Az értékeket IU/ml-ben vagy EU/ml-ben (l. 11. fejezet, átszámítási táblázat) fejezhetjük ki. A 2-es kalibrátor oldat (1 IU/ml vagy 10 EU/ml) felel meg a cut-off értéknek, és a kvalitatív kimutatásnál is használhatjuk. A kalibrátor sorozat értékei a következők: 0.5, 1, 5, 10, 20 IU/ml a **„WHO által javasolt nemzetközi standarddal”** titrálva.
Színe: a kalibrátor oldatok színintenzitása arányos a megfelelő ellenanyag titerrel.

CONJ — ***KONJUGÁT: 1 x 16 ml***
Tartalma: peroxidázzal jelölt monoklonális antitestek 0.05% fenolt és 0.02% Bronidoxot tartalmazó foszfát pufferben. Hígítás nélkül azonnal felhasználható.

CONTROL IgG - ***IgG NEGATÍV KONTROLL (PF93910): 1 x 1.6 ml***
A KÜLÖNBÖZŐ LOTSZÁMÚ TERMÉKEK CSERESZABATOSAK.
Tartalma: 1% BSA-t és 0.09% nátrium-azidot tartalmazó 0.01 mol/l foszfát pufferes, anti-CMV IgG ellenanyagot nem tartalmazó humán szérum. Hígítás nélkül azonnal felhasználható (0-ás kalibrátor oldat).
Stabilitás: Bontatlan állapotban, +2-8°C között tárolva a termék a szavatossági idő lejártáig megőrzi a minőségét.

WASH BUF 10x ***MOSÓPUFFER 10X (PF93603): 1X100 ml***
A KÜLÖNBÖZŐ LOTSZÁMÚ TERMÉKEK CSERESZABATOSAK.
Tartalma: 10-szeres töménységű, 0.5% Brij-t tartalmazó foszfát pufferes sóoldat.
Elkészítése: 1:10 arányban hígítsuk desztillált vízzel a kívánt mennyiséget, hogy megkapjuk a felhasználásra kész oldatot. Ha kristályokat látunk benne, akkor azokat hígítás előtt 37°C-on oldjuk fel.

SAMP DIL 50x ***MINTAHÍGÍTÓ 50X (PF93601): 1 x 4.5 ml. Szérumminták hígításához.***
A KÜLÖNBÖZŐ LOTSZÁMÚ TERMÉKEK CSERESZABATOSAK.
Tartalma: 0.05% fenollal és 0.02% Bronidox-szal kiegészített, 50X töménységű fehérjeoldat.
Előkészítése: 1:50 arányban hígítsuk a kívánt mennyiséget a mosópufferrel, hogy megkapjuk a felhasználásra kész mintahígítót.

SUBS TMB ***SZUBSZTRÁT (PF93619): 12 ml. Felhasználásra kész.***
A KÜLÖNBÖZŐ LOTSZÁMÚ TERMÉKEK CSERESZABATOSAK.
Tartalma: 0.05 mol/l-es citrát pufferben (pH: 3.8) stabilizált, 0.26 mg/ml tetrametil-benzidint (TMB) és 0.01% hidrogén-peroxidot tartalmazó oldat.

H_2SO_4 0.3 M ***LEÁLLÍTÓ OLDAT (PF93602)*****: 1x 16 ml**
A KÜLÖNBÖZŐ LOTSZÁMÚ TERMÉKEK CSERESZABATOSAK.
0.3 mol/l-es kénsav oldat. Hígítás nélkül azonnal felhasználható.

Öntapadó fólia (2)
Polietilén tasak (1)

SZÜKSÉGES, DE NEM SZÁLLÍTOTT ESZKÖZÖK

- Mikrolemez-inkubátor, 37°C-os.
- Mikrolemez leolvasó 450 vagy 450/620 nm-es, és 405 nm-es szűrővel, legalább OD=2.000 linearitással.
- Mikrolemez mosó készülék (lehetőség szerint), 225-375 μl adagolására.
- Desztillált, vagy ionmentes víz.
- Laboratóriumi üvegáru: mérőhengerek, kémcsövek stb.
- Mikropipetták 10, 100 és 1000 μl kiméréséhez és adagolásához.
- Eldobható védőkesztyű.
- Stopperóra
- Nátrium-hipoklorit oldat (5%).
- Biológiailag veszélyes hulladék gyűjtő tartály.
- Szűrőpapír.

5. REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS SZAVATOSSÁGI IDEJE

A reagenseket +2 -8°C közötti hőmérsékleten tároljuk.
A szavatossági idő a dobozon és az üvegek címkéjén olvasható.

Felnyitás és/vagy elkészítés után a reagensek csak korlátozott ideig használhatók fel.

REAGENS	**KÖRÜLMÉNYEK**
Mikrolemez	+2-8°C-on, polietilén tasakban tárolva 6 hét
Kalibrátor oldatok	+2-8°C-on tárolva 6 hét
Konjugát	+2-8°C-on tárolva 6 hét

Szubsztrát	+2-8°C-on tárolva a szavatossági ideig, +15-30°C-on 1 hét; sötétben tároljuk.
Mintahígító	Felhasználásra kész; +2-8°C-on tárolva 2 hét
Mosópuffer	+2- 8°C-on tárolva 2 hét, +15-30°C-on 5 nap
Leállító oldat	+2-8°C-on tárolva a szavatossági idő lejártáig

6. KEZELÉSI ÉS MUNKAVÉDELMI ELŐÍRÁSOK

KIZÁRÓLAG *IN VITRO* LABORATÓRIUMI CÉLOKRA HASZNÁLHATÓ.

A tesztkit FDA ajánlások szerint bevizsgált, és HbsAg-re, anti-HIV1, anti-HIV2 és anti-HCV antitestekre negatívnak talált humán eredetű anyagokat is tartalmaz. Mivel azonban egyetlen diagnosztikai módszer sem garantálja tökéletesen, hogy nincsenek jelen fertőző ágensek, ezért minden humán eredetű anyagot fertőző betegség közvetítésére képes anyagnak kell tekinteni. Humán eredetű anyagok kezelésekor minden szokásos laboratóriumi óvórendszabályt be kell tartani.

Egészségügyi és biztonsági előírások

1. Ne pipettázzunk szájjal. A reagensek és a minták kezelésekor viseljünk védőszemüveget és eldobható védőkesztyűt. Munka után alaposan mossunk kezet.
2. Az alábbi reagensek kis koncentrációban káros, vagy irritáló anyagokat tartalmaznak:
   a) a mosópuffer detergenseket tartalmaz
   b) a konjugát fenolt tartalmaz
   c) a szubsztrát savas kémhatású
   d) a kontrollok tartósítószerként 0.09% nátrium-azidot tartalmaznak, amely a vízvezetékek ólom vagy réz falával reakcióba lépve robbanásveszélyes fémazidokat képezhet. Kiöntés után bő vízzel mossuk át a lefolyót.

   Ha bármelyik reagens a bőrre vagy a szembe kerül, azonnal mossuk le az érintett területet bő vízzel.
3. A többször felhasználható eszközöket alkalmazásuk után sterilezni kell. Javasolt módszer: autoklávozzuk 1 órán át, 121°C-on. Az eldobható eszközöket autoklávozzuk, vagy égessük el.
4. A leállító oldatban található kénsav és az üvegáru mosásához alkalmazott sósav korrozív, ezért elővigyázattal kezeljük. Ha szembe vagy bőrre kerülnek, az érintett testrészt azonnal mossuk le alaposan bő vízzel.
5. A semlegesített savakat és egyéb folyadékokat olyan mennyiségű nátrium-hipoklorit hozzáadásával dekontamináljuk, hogy annak végső koncentrációja legalább 1.0%-os legyen. 30 perces 1%-os hypos áztatás elegendő lehet a hatásos fertőtlenítéshez.
6. A kiömlött potenciálisan fertőző anyagokat szűrőpapírral azonnal fel kell itatni, és az elszennyeződött felületeket pl. 1.0%-os nátrium-hipokloritos szivaccsal le kell törölni a munka folytatása előtt. Savas folyadékok fertőtlenítéséhez ne használjunk nátrium-hipokloritot, csak a felületet szárazra törlése után. A kiömlött folyadékok eltakarításához használt eszközöket, beleértve a védőkesztyűt is, mint biológiailag potenciálisan veszélyes hulladékot ártalmatlanítani kell. Nátrium-hipokloritot tartalmazó anyagokat ne autoklávozzunk.

Analitikai előírások

1. Használatba vétel előtt hagyjuk szobahőmérsékletre (+18-30°C) melegedni a reagenseket és a mintákat. Közvetlenül a felhasználás után tegyük vissza a reagenseket az ajánlott tárolási hőmérsékletű helyre. **Nagyon fontos, hogy a megfelelő hőmérsékleten dolgozzunk. Biztosítsuk, hogy az inkubátor hőmérséklete ne csökkenjen 35°C alá, és ne emelkedjen 39°C fölé.** A tesztcsíkokat tartalmazó tasakot csak az után bontsuk fel, hogy az már legalább ½ órát állt szobahőmérsékleten.
2. Ne használjunk lejárt szavatosságú reagenseket. Ügyeljünk arra, hogy a reagensekbe ne kerülhessenek mikroorganizmusok, mert ez lerövidítheti a termék élettartamát, és hamis eredményeket okozhat.
3. Ne változtassunk a tesztprotokollon, és ne pótoljuk a reagenseket más gyártótól származó, vagy más gyártási sorozatba tartozó termékekkel, kivéve, ha azok kifejezetten csereszabatossága garantált. Ne rövidítsük le az inkubálási időket.
4. A reagensekhez használt bármilyen üvegárut 2M sósavval alaposan át kell mosni, majd desztillált vízzel, vagy jó minőségű ionmentes vízzel kiöblíteni.
5. Ügyeljünk arra, hogy tároláskor, vagy inkubálás során a reagenseket ne tegyük ki erős fény hatásának, vagy hipoklorit gőzöknek.

6. Ne hagyjuk beszáradni a tesztlyukakat a műveletek során.
7. Ügyeljünk arra, hogy ne következhessen be keresztszennyeződés a reagensek között. Fontos, hogy az egyes reagensek beméréséhez külön pipettát jelöljünk ki.
8. Vigyázzunk arra, hogy a konjugát ne érjen, vagy ne kerüljön a tesztlyuk szélére. Vigyázzunk, hogy bepipettázáskor ne spricceljen ki az oldat.
9. Enzim-immunassay során olykor felléphet az ú.n. „peremhatás" jelenség, amelyet a páratartalom növelésével kell minimálisra csökkenteni az inkubálás során. A lemezeket zárjuk le takarófóliával és 37°C-on inkubáljuk inkubátorban, vagy megfelelő lemeztartóval ellátott vízfürdőben. Az inkubálás megfelelő microplate-analizátorban is végezhető. Lásd a megfelelő berendezés használati útmutatóját. Széndioxid-inkubátorokat nem szabad használni.
10. A leolvasás előtt győződjünk meg arról, hogy a lemez alja tiszta és száraz, és hogy nincsenek buborékok a folyadék felszínén.
11. Erősen hemolizált, elégtelenül megalvadt vérből származó savó, vagy mikroorganizmusokkal szennyezett minták esetén hibás eredményeket kaphatunk.
12. Minden alkalmazott készülék használati utasítását alaposan olvassuk el az alábbiak tekintetében:
    - installálás és szükséges eszközök
    - működési elv, útmutató biztonsági rendszabályok és kockázatok
    - gyártó specifikációja és teljesítmény adatok
    - javítás és karbantartás

7. FELDOLGOZHATÓ MINTÁK ÉS TÁROLÁSUK

Az ajánlott minta rutin eljárás szerint vett, vénás vérből származó, és a helyes laboratóriumi gyakorlat (GLP) előírásai szerint kezelt szérum. A friss szérum 4 napig tárolható +2-8°C között, vagy hosszabb ideig -20°C-on lefagyasztva. Ne olvasszuk fel a mintákat háromnál többször. A kiolvasztott mintákat mérés előtt óvatosan rázzuk fel. A minta minőségét a mikrobiológiai szennyeződés erősen rontja, és hamis eredményekhez vezethet.
Kerüljük az erősen lipémiás, icterusos vagy elszennyeződött minták használatát. Ha újabb minta vételére nincs lehetőség, a zavaros mintákat szűréssel (0.45 μm), vagy centrifugálással tisztítsuk meg.
Humán plazma a vizsgálatra nem alkalmas.

8. A TESZT KIVITELEZÉSE

Manuális technika

- Készítsük ki a szükséges számú tesztcsíkot.
- Készítsük el a mosófolyadékot a 10-szeres töménységű mosópuffer hígításával (100 ml + 900 ml víz).
- Készítsük el a mintahígítót: adjunk 1 résznyi 50X töménységű hígítót 49 rész mosópufferhez (pl. 2 ml + 98 ml).

Hígítsuk a mintákat 1:101 arányban: 10 μl szérumot adjunk 1 ml hígítóhoz. Minden hígított mintából mérjünk 100 μl-t egy-egy tesztlyukba (ajánlatos két párhuzamossal dolgozni). A kalibrátorokat HÍGÍTATLANUL mérjük egy tesztcsíkba, tesztlyukanként 100μl-t (ha lehet, két párhuzamosban). Hagyjunk egy tesztlyukat szabadon vak referenciaként, ide majd 100 μl szubsztrát keverék kerül.
A tesztlyukakat fedjük le az öntapadó fóliával, majd inkubáljuk 45 percig 37°C-on. Ezután mossuk négyszer 30 másodpercig (300 μl), mérjünk 100 μl konjugátot minden tesztlyukba, majd inkubáljuk újból 45 percig 37°C-on, öntapadó fóliával lefedve a lemezt. Végezzünk további négy mosást fentiek szerint. Végül mérjünk 100 μl szubsztrátot be minden tesztlyukba.
Hagyjuk 15 percig állni szobahőmérsékleten, majd 100 μl leállító oldattal állítsuk le az enzimes reakciót.
Az abszorbanciát (OD) 450 nm-en vagy 450/620 nm-en olvassuk le, 30 percen belül. Ha az OD 2.000-nél nagyobb, akkor mérjük újra 405 nm-en.

9. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

Manuális technika

1. LÉPÉS — Mérjünk 100 μl hígított mintát/kontrollt a tesztcsíkok tesztlyukaiba.

Inkubáljuk 45 percig 37°C-on.

	Mossuk négyszer (300 μl).
2. LÉPÉS	Mérjünk 100 μl konjugátot minden tesztlyukba.
	Inkubáljuk 45 percig 37°C-on.
	Mossuk négyszer (300 μl).
3. LÉPÉS	Mérjünk 100 μl szubsztrátot minden tesztlyukba.
	Inkubáljuk 15 percig szobahőmérsékleten.
4. LÉPÉS	Mérjünk 100 μl leállító oldatot.
	30 percen belül olvassuk le az abszorbanciát 450 nm-en.

10. A VIZSGÁLAT VALIDÁLÁSA

1. **NEGATÍV KONTROLL:** („Kalibrátor 0"). A negatív kontroll OD-értéke legyen 0.6-szer kisebb, mint a „Kalibrátor 2" OD értéke.
2. „Kalibrátor 2" OD értéke 450 nm-en legyen >= 0.2 mérve; 450/620 nm-en legyen >= 0.16
3. „Kalibrátor 5" OD értéke legyen nagyobb, mint 1.2

11. AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

KVANTITATÍV EREDMÉNYEK
A kalibrátor oldatok OD-értékéből vonjuk ki a vak referencia értékét (≤0.150), majd ábrázoljuk az eredményeket diagramon. A vizsgálati mintának megfelelő titert a görbéről olvashatjuk le.
MEGJEGYZÉS: a kalibrációs görbét minden vizsgálathoz vegyük fel.
Ha bármely minta vagy kalibrátor OD értéke nagyobb, mint 2.0, mérjük újra 405 nm-en, majd a kapott értéket szorozzuk meg 3-mal.

Az OD érték átszámítása egység/ml-re
Az anti-cytomegalovírus IgG mennyiségét EU/ml-ben (önkényesen választott egység), vagy IU/ml-ben fejezhetjük ki (javasolt WHO standard anti-CMV IgG-re), a minta eredményét a 6 kalibrátorral felvett görbéről leolvasva.

1. táblázat: a kalibrátorok értékei önkényes, és nemzetközi egységben

	EU/ml	IU/ml
0 kalibrátor	0	0
1 kalibrátor	5	0.5
2 kalibrátor	10	1
3 kalibrátor	50	5
4 kalibrátor	100	10
5 kalibrátor	200	20

Az immunitás mértéke az alábbiak szerint fejezhető ki:

IMMUNIZÁLT: ha a minta anti-Cytomegalovírus IgG koncentrációja >12 EU/ml, vagy >1.2 IU/ml

NEM IMMUNIZÁLT: ha a minta anti-cytomegalovírus IgG koncentrációja < 8 EU/ml, vagy > 0.8 IU/ml.

KÉTES: ha az eredmény a fenti két érték közé esik. Ekkor ajánlatos a vizsgálatot két párhuzamossal megismételni.

KVALITATÍV EREDMÉNYEK
Számítsuk ki a minta és a cut-off (2-es kalibrátor) OD értékének arányát. A mintát az alábbiak szerint soroljuk be:
Pozitív: ha az arány > 1.2
Kétes: ha 0.8 < OD < 1.2

<u>Negatív:</u> ha az arány < 0.8.

Ha az eredmény kétes, ismételjük meg a mérést. Ha még ezután is kétes, akkor vegyünk újabb vérmintát.

12. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

A fertőzés akut stádiumában vett szérumminta negatívnak bizonyulhat ezzel a teszttel, mivel ekkor még csak IgM ellenanyag van jelen.
Ellentétben az anti-CMV IgM-mel, az anti-CMV IgG meghatározásnál a vizsgálati minta hő-inaktiválása nem okoz hamis eredményt.
A Cytomegalovírus elleni IgM szintet Platelia™ CMV IgM tesztkittel határozzuk meg. Egy másik lehetőség, ha 8-14 nappal később második vérmintát is veszünk, ezt az első mintával párhuzamosan lemérjük, és megállapítjuk az IgG ellenanyag szintjének növekedését.
A vizsgálat eredményét a kórelőzménnyel és egyéb diagnosztikai eljárások eredményeivel összevetve kell felhasználni.

13. ANALITIKAI SPECIFICITÁS

23 Rubeola, Epstein-Barr, Herpes simplex, kanyaró vagy mumpsz elleni IgG ellenanyagot tartalmazó CMV-negatív minta vizsgálata során a fenti ellenanyagok egyike sem befolyásolta az eredményt.

14. DIAGNOSZTIKAI ÉRZÉKENYSÉG ÉS SPECIFICITÁS

Egy kórházi laboratóriumban lefolytatott klinikai vizsgálat során 264, köztük 47 negatív és 217 pozitív mintát vizsgáltak egy másik, kereskedelmi forgalomban kapható enzim-immunassay-vel összehasonlítva. A két módszer eredményei 100%-os egyezést mutattak mind a pozitív, mind a negatív mintáknál.

A Platelia™ CMV IgG kit érzé kenysége és specificitása egyaránt 100%-os.

15. PRECÍZIÓ

2. táblázat: teszten belüli ismételhetőség 3 különböző gyártási számmal:

Cut-off n=21	***Gy. sz. 104***	***Gy. sz. 105***	***Gy. sz. 106***
OD	0.453	0.374	0.433
CV%	4.62	4.73	4.07

3. táblázat: tesztek közötti precízió:

	EU/ml			
Minta	**I. teszt**	**II. teszt**	**III. tesz**	**CV%**
1.	12.6	17.5	17.6	18
2.	78.5	87.5	96.3	10

16. HIBAELHÁRÍTÁS

PROBLÉMA	**LEHETSÉGES OK**	**VIZSGÁLAT VAGY TEENDŐK**
Érvénytelen vizsgálat (minden negatív)	Egy vagy több reagenst nem, vagy rossz sorrendben mértünk be.	Ellenőrizzük a munkamenetet. Ellenőrizzük a fel nem használt reagenseket. Ismételjük meg a mérést.
	Hibás lemez	Ellenőrizzük a kódszámot a lemez csomagolásán (a helyes kódszámot lásd a tájékoztató 4. pontjánál)
		Ellenőrizzük, nem nedves-e a még használatlan lemez. (A szilikagélnek halványsárgának kell lennie). Ismételjük meg a mérést.
Érvénytelen futtatás	Elszennyeződött a szubsztrát.	Dolgozzunk új szubsztráttal.

PROBLÉMA	LEHETSÉGES OK	VIZSGÁLAT VAGY TEENDŐK
(minden pozitív)		
	Elégtelen mosás	Gondoskodjunk a mosóberendezés jó működéséről.
Pontatlan mérés	A tesztlyukak mosása nem megfelelő	Gondoskodjunk a mosóberendezés jó működéséről.
	A tesztlyukak kiürítése nem megfelelő.	Gondoskodjunk a mosóberendezés jó működéséről.
	Pipettázási hiba	Ellenőrizzük a pipetta működését.
	A reagens adagolása túl lassú.	Vigyázzunk, hogy a mosás után ne száradjon be a lemez. Azonnal mérjük be a reagenseket.
	Buborékok jelenléte	Pipettázás során kerüljük el a buborékképződést.
	A fényút nem szabad	Ellenőrizzük a készülék fényforrását és a detektort, hogy nincsenek-e elszennyeződve. Puha ronggyal töröljük le a lemez alját.
Elégtelen színképződés	Pontatlan inkubálási idő vagy hőmérséklet.	Ellenőrizzük a hőmérséklet és az idő beállítását.
		Ragaszkodjunk az ajánlott utasításokhoz.
	Elégtelen szubsztrát bemérés	Ellenőrizzük a pipetta működését.

17. HIVATKOZÁSOK

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. H.O. Kangro: Cytomegalovirus serology: does it give the answer? Serodiagnosis and Immunotherapy 1: 91 (1987).
3. Grint P.C.A. et al.: Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products. J. Clin. Pathol. 38: 1059 (1985).
4. M. Musiani et al.: Rapid detection of antibodies against cytomegalovirus induced immediate early and early antigens by an enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Pathol. 37: 122 (1984).
5. F. de Ory et al.: Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. Serodiagnosis and Immunotherapy 2: 423 (1988).
6. P. Dal Monte et al.: Cytomegalovirus umano. Diagnosis 2: 67 (1990).
7. R. Ziegalmaier et al.: ELISA. la Ricerca Clin. Lab. 10: 83 (1980).

CE	- CE jelzés (Európai direktíva 98/79/CE az in vitro diagnosztikai célú orvosi eszközökről)
IVD	- Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra!
	- Gyártó
	- Tárolási hőmérsékleti határok
	- Lásd a használati utasítást



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00
Fax : +33 (0)1 47 41 91 33



0459
12/2004